



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



*“Πληθυσμιακή γενετική δομή του ζωνοδέλφινου, *Stenella coeruleoalba*, στον Κορινθιακό και Πατραϊκό κόλπο με στόχο την διατήρηση του γενετικού αποθέματος του”*

της φοιτήτριας **Αγάπης Βέικου**

Επιβλέπων Καθηγητής: **Εξαδάκτυλος Αθανάσιος**

ΒΟΛΟΣ, 2008



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

---

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Αγάπη Βέικου**

**« Πληθυσμιακή γενετική δομή του ζωνοδέλφινου, *Stenella coerulealba*, στον Κορινθιακό και Πατραϊκό κόλπο με στόχο την διατήρηση του γενετικού αποθέματος του. »**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Εξαδάκτυλος Αθανάσιος**

**ΒΟΛΟΣ, 2008**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 6818/1  
Ημερ. Εισ.: 13-01-2009  
Δωρεά: Συγγραφέας  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΙΥΠ  
2008  
ΒΕΙ

**Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής**

**1. Εξαδάκτυλος Αθανάσιος, Επιβλέπων**

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**2. Νεοφύτου Χρήστος, Μέλος**

Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**3. Παναγιωτάκη Παναγιώτα, Μέλος**

Επίκουρος Καθηγήτρια Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Στους γονείς μου

Γιάννη, Δόμνα

## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Ιχθυολογίας – Υδρολογίας και Γενετικής, του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών Κρήτης (ΕΛΚΕΘΕ). Στόχος αυτής της έρευνας ήταν να εφαρμοστούν οι γενετικές τεχνικές προς κατανόηση της εξέλιξης της γενετικής σύνθεσης πληθυσμών του ζωνοδέλφινου στην περιοχή του Κορινθιακού-Πατραϊκού Κόλπου και η σύγκρισή τους με τους πληθυσμούς του Αιγαίου, της Λεβαντινής Θάλασσας, του Ατλαντικού, με απώτερο στόχο τη διατήρηση του γενετικού αποθέματος του, στα πλαίσια της συνθήκης ACCOBAMS. Η πραγματοποίηση της διατριβής έγινε στα πλαίσια του προγράμματος Πυθαγόρας II.

Η διεξαγωγή της παρούσης εργασίας θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί χωρίς την ουσιαστική συμβολή και την πολύτιμη βοήθεια πολλών ανθρώπων. Θεωρώ υποχρέωσή μου να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου σε όλους όσους με βοήθησαν και με υποστήριξαν, κάνοντας συγχρόνως προσπάθεια ώστε να μην παραλείψω ούτε και αδικήσω κανέναν.

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα αυτής της διπλωματικής εργασίας τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Εξαδάκτυλο Θανάση για την προθυμία του, τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις, για τις εποικοδομητικές συζητήσεις, αλλά και για την διαρκή του υποστήριξη τόσο κατά την πραγματοποίηση του εργαστηριακού και συγγραφικού μέρους της παρούσης εργασίας, όσο και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επίσης, θερμά ευχαριστώ τον κ. Ποδιάδη Βασίλη και κ. Fabio Sciniscalchi, πρόεδροι ομάδας παρακολούθησης και προστασίας των θαλάσσιων κητωδών και μέλη της ερευνητικής ομάδας ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II, που μου έδωσαν την ευκαιρία να πάρω μέρος σε ερευνητικό ταξίδι το 2005 και να συναντήσω από κοντά δελφίνια. Μια αξέχαστη εμπειρία ζωής που μου άλλαξε τον τρόπο σκέψης και συντέλεσε στο να γίνω και εγώ ενεργό μέλος για την προστασία κητωδών και του πλανήτη γενικά.

Επίσης ευχαριστώ τον Καθηγητή κ.Νεοφύτου Χρήστο και την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Παναγιωτάκη Παναγιώτα, για τις συμβουλές τους και τις παρεμβάσεις του κατά τη διεξαγωγή του πειράματος και της συγγραφής της εργασίας, καθώς και το διδακτικό έργο που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Οι χρήσιμες πληροφορίες, υποδείξεις και συμβουλές που μου έδωσε ο μεταπτυχιακός φοιτητής, «δάσκαλος» και φίλος, Γκάφας Γιώργος, ήταν απαραίτητες, γι' αυτό δεν θα μπορούσα να παραλείψω να τον ευχαριστήσω θερμά για όλη του την υποστήριξη και τις γνώσεις που μου προσέφερε στον τομέα της γενετικής, καθώς και για τις πολύωρες συζητήσεις, άμεσες και έμμεσες, μαζί του για σχετικά, με το αντικείμενο, και μη θέματα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή Μαλανδράκη Μανώλη για τη βοήθεια που μου προσέφερε, καθώς και την φίλη μου Σταμουλάκη Ξανθή για όλα αυτά τα 5 χρόνια φιλίας και για την συμπαράστασή της σε όλους τους τομείς σε επαγγελματικό και προσωπικό επίπεδο.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και ιδιαίτερα στους γονείς μου, Γιάννη και Δόμνα, για την αμέριστη ηθική και υλική ανιδιοτελή συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου, καθώς και στην αδερφή μου Φένια...

Τα 5 χρόνια σπουδών μου τελείωσαν και θα μου μείνουν αξέχαστα...

Σας ευχαριστώ όλους θερμά!!

Αγάπη

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....</b>	<b>7</b>
<b>Εισαγωγή .....</b>	<b>7</b>
1.1. Γενικά.....	7
1.2. Βιολογία του Ζωνοδέλφινου <i>Stenella coeruleoalba</i> .....	9
1.2.1. Συστηματική κατάταξη και περιγραφή του είδους.....	9
1.2.2. Εξωτερική μορφολογία.....	10
1.2.3. Διατροφή.....	11
1.2.4. Κατανομή-Γεωγραφική Εξάπλωση.....	12
1.2.5. Μέγεθος πληθυσμού.....	13
1.2.6. Αναπαραγωγή.....	14
1.3.1. Μοριακές τεχνικές.....	15
1.3.2. Γενετικοί δείκτες.....	18
1.3.3. Χρήση Μοριακών τεχνικών στο είδος <i>Stenella coeruleoalba</i> .....	23
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....</b>	<b>26</b>
<b>Στοιχεία Γενετικής.....</b>	<b>26</b>
2.1. Υλικά και Μέθοδοι .....	26
2.1.1. Περιοχές προέλευσης και επεξεργασία δειγμάτων.....	26
2.1.2. Εξαγωγή DNA .....	31
2.1.3. Ηλεκτροφόρηση DNA.....	33
2.1.4. Μελέτη μικροδορυφορικών τόπων.....	34
2.1.5. Στατιστική ανάλυση .....	39
2.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση .....	40
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....</b>	<b>47</b>
<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>47</b>
 <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>50</b>
 <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>56</b>



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η εξέλιξη της γενετικής σύνθεσης πληθυσμών του ζωνοδέλφινου (*Stenella coeruleoalba*) στην περιοχή του Κορινθιακού-Πατραϊκού Κόλπου με τη χρήση γενετικών δεικτών και έγινε σύγκρισή τους με τους πληθυσμούς του Αιγαίου, της Λεβαντινής Θάλασσας, του Ατλαντικού, με απώτερο στόχο τη διατήρηση του γενετικού αποθέματος του, στα πλαίσια της συνθήκης ACCOBAMS.

Η μελέτη αφορούσε πληθυσμούς ζωνοδέλφινων από τη Μεσόγειο και τον Ατλαντικό, δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια ερευνητικού ταξιδιού στον Κορινθιακό-Πατραϊκό Κόλπο και από άλλα τα οποία είχαν συλλεχθεί σε παλιότερα ερευνητικά ταξίδια, όπως, επίσης, και από ορισμένα ξεβρασμένα δελφίνια στις ακτές.

Η γενετική παραλλακτικότητα, ο δείκτης ενδογαμίας, η ετεροζυγωτία και η ενδοειδική ροή γονιδίων μελετήθηκε σε συνολικά 46 άτομα (43 δείγματα από ζωνοδέλφινο και 3 από κοινό δελφίνι) που προήλθαν από πληθυσμούς του Κορινθιακού-Πατραϊκού Κόλπου, του Ατλαντικού, της Λεβαντινής Θάλασσας (κοντά στο Ισραήλ) και του Αιγαίου, με τη χρήση μικροδορυφορικού DNA. Επίσης, υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις οι οποίες απεικονίστηκαν σε δένδρογράμματα.

Από την ανάλυση των αλληλομορφικών συχνοτήτων προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών του Ατλαντικού με αυτούς της Μεσογειακής Λεκάνης. Από τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας συμπεραίνεται ότι το ζωνοδέλφινο ίσως να μην έχει σχηματίσει ακόμη τοπικούς απομονωμένους αναπαραγωγικά και γεωγραφικά πληθυσμούς και χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό γονιδιακής ροής. Το σχέδιο αυτό της πληθυσμιακής δομής επηρεάστηκε σαφώς από την κοινωνική δομή των διάφορων ομάδων και τη συμπεριφορά διασποράς τους, αν και όποιες διαφορές αποκαλύφθηκαν μεταξύ των πληθυσμών, αφορούσαν πιθανώς διαφορές στη χρήση βιότοπου.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Τα κητώδη ανήκουν σε μια ομάδα θαλασσίων θηλαστικών που χαρακτηρίζεται από υψηλή ποικιλομορφία στα είδη. Οι φάλαινες, τα δελφίνια και οι φώκες συμπεριλαμβάνονται στις δυο υποτάξεις και στις 13 οικογένειες της τάξης των κητωδών. Όλα τα μέλη αυτής της τάξης είναι πλήρως προσαρμοσμένα στο θαλάσσιο περιβάλλον και έχουν τροποποιήσεις που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν στο υδάτινο ενδιαίτημα. Οι τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνουν υδροδυναμικό σχήμα σώματος, μεγάλο μέγεθος, μειωμένα ή τροποποιημένα άκρα, και παχύ θερμομονωτικό στρώμα υποδόριου λίπους. Τα κητώδη είναι, επίσης, σχεδόν αποκλειστικά σαρκοφάγα (Gkafas et al, 2007)

Για τη διατήρηση των πληθυσμών των κητωδών, χρειάζεται να γνωρίζουμε πρωταρχικής σημασίας πληροφορίες, όπως είναι η γεωγραφική κατανομή αλλά και χωροχρονική, το μέγεθος πληθυσμού και αν αυτός αυξάνεται ή μειώνεται. Οι βασικές αυτές πληροφορίες είναι δύσκολο να αποκτηθούν, κάνοντας την έρευνα για τα κητώδη ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα. Οι κυριότερες αντιξοότητες που αντιμετωπίζονται είναι οι παρακάτω ότι η πλειοψηφία των κητωδών περνά το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους κάτω από την επιφάνεια του νερού, κινούνται συνεχώς και το ενδιαίτημα τους είναι πολύ μεγάλο και αφιλόξενο για τον άνθρωπο. Παρόλα αυτά, καθώς είναι αναγκαίο να επιστρέψουν στην επιφάνεια για να αναπνεύσουν, η χρήση του ενδιαίτηματος μπορεί να διερευνηθεί από την κατανομή τους στην επιφάνεια και τη μελέτη της συμπεριφοράς τους όταν παρατηρούνται (Ποδιάδης, 2008).

Υπάρχουν αρκετές αναφορές για την παρουσία και την κατανομή των κητωδών στη δυτική και κεντρική Μεσόγειο (Cavalloni, 1993; Notarbartolo di Sciara & Gordon, 1993), αλλά πολύ λίγες για την ανατολική λεκάνη (Frantzis et al, 2002; Cebrian et al, 1992). Λίγα, επίσης, είναι γνωστά για την κοινωνική και γενετική σύνθεση του ζωνοδέλφινου (*Stenella coeruleoalba*) στη Μεσόγειο: μόνο μερικές έρευνες για την γενετική πληθυσμιακή δομή του συγκεκριμένου είδους, είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία (Mirimin et al, 2006; Gaspari et al, 2007; Gaspari 2004; Garcia-Martinez et al, 1995 & 1999; Aguilar, 1991; Bourret et al, 2007; Forcada et al, 1994 & 1998; Di Natale, 1983). Οι αντιπαραβαλλόμενες πτυχές της οικολογίας και της βιολογίας τους προτρέπουν ότι μια συγκριτική προσέγγιση θα διευκόλυνε γενικά την κατανόηση της

κοινωνικής συμπεριφοράς των δελφινιών. Η προσπάθεια να υπολογιστεί η γενετική ποικιλότητα και το καθορισμένο επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των μεσογειακών και των πληθυσμών του Ατλαντικού, επιτεύχθηκε με τη χρήση του μικροδορυφορικού DNA ως μοριακού γενετικού δείκτη.

Σκοπός της προκαταρκτικής πειραματικής αυτής εργασίας είναι η χρήση πρότυπων γενετικών δεικτών για την καταγραφή του πολυμορφισμού των πληθυσμών του ζωνοδέλφινου στην περιοχή του Κορινθιακού και Πατραϊκού κόλπου και η σύγκρισή τους τόσο με άλλους πληθυσμούς της Μεσογείου, όσο και του Ατλαντικού, καθώς και η διερεύνηση της πληθυσμιακής δομής με στόχο τη διατήρηση του αποθέματός του. Η συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε μέσα στα πλαίσια της συνθήκης ACCOBAMS (Συμφωνία Διατήρησης των κητωδών της Μαύρης Θάλασσας, της Μεσογείου και του γειτονικού Ατλαντικού Ωκεανού, 2001), σύμφωνα με την οποία η κατάσταση των κοινών δελφινιών στη Μεσόγειο θα έπρεπε να αποτιμηθεί σε ευρεία κλίμακα με σκοπό την εκτίμηση της κατανομής και αφθονίας σε κάθε σημείο της λεκάνης, αναγνωρίζοντας τα κρίσιμα σημεία και χαρακτηρίζοντας τους κινδύνους.

## 1.2. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΖΩΝΟΔΕΛΦΙΝΟΥ

### 1.2.1. Συστηματική κατάταξη και περιγραφή του είδους

Το ζωνοδέλφινο είναι ένα από τα πέντε είδη που ανήκουν στο γένος *Stenella*. Ωστόσο, μια σύγχρονη γενετική εργασία του Leduc et al, (1999) υποδηλώνει ότι το γένος αυτό δεν είναι μια φυσική ομάδα, όπως έχει μέχρι πρότινος θεωρηθεί. Σύμφωνα με αυτήν την έρευνα, οι πλησιέστεροι συγγενείς του ζωνοδελφίνου είναι το *Clymene dolphin*, το κοινό δελφίνι, το σταχτοδέλφινο του ατλαντικού και το *Tursiops aduncus*, που από παλιότερα θεωρείται ως υποείδος του *Bottlenose dolphin*. Το ζωνοδέλφινο (Εικ. 1.1.) ταξινομήθηκε από το Meyen το 1833: το επιστημονικό του όνομα *coeruleoalba* (από το λατινικό “*caeruleus*” που σημαίνει βαθύ μπλε και από το “*albus*” που σημαίνει λευκό) Η συστηματική κατάταξη του ζωνοδελφίνου *S. coeruleoalba* σύμφωνα λοιπόν με τον Meyen (1833) είναι η παρακάτω:

<b>ΒΑΣΙΛΕΙΟ</b>	Animalia
<b>ΦΥΛΟ</b>	Chordata
<b>ΚΛΑΣΗ</b>	Mammalia
<b>ΥΠΟΚΛΑΣΗ</b>	Eutheria
<b>ΤΑΞΗ</b>	Cetacea
<b>ΥΠΟΤΑΞΗ</b>	Odontoceti
<b>ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ</b>	Delphinidae
<b>ΓΕΝΟΣ</b>	<i>Stenella</i>
<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<i>coeruleoalba</i>
<b>ΚΟΙΝΟ-ΑΓΓΛΙΚΟ ΟΝΟΜΑ</b>	Striped dolphin Euphrosyne dolphin whitebelly Meyen’s dolphin Gray’s dolphin Streaker porpoise
<b>ΜΗΚΟΣ</b>	1,9-2,6 m
<b>ΒΑΡΟΣ</b>	90-150 kg



Εικόνα 1.1. *Stenella coeruleoalba* (Πηγή ίδια)

### 1.2.2. Εξωτερική μορφολογία

Το σώμα του ζωνοδέλφινου σε γενικές γραμμές είναι ίδιο με αυτό των περισσότερων μικρών ωκεάνιων δελφινιών. Το χρώμα του είναι άσπρο-μπλε με μια σκοτεινή ραχιαία κάπα και ανοιχτόχρωμο στην κοιλιακή χώρα. Το μήκος του κυμαίνεται από 2,2-2,6 m, ενώ το βάρος του από 100-150 kg. Το στόμα του αποτελείται από 40-45 μικρά, κοφτερά δόντια σε κάθε οδοντοστοιχία, χαρακτηριστικά του είδους του.

Εύκολα διακρίνεται στη θάλασσα από την ιδιαίτερη ζώνωση που φέρει στο σώμα του (Εικ. 1.2.). Πρόκειται για μια αχνή γκριζα γραμμή που ξεκινά ως διακλάδωση της κύριας ζώνωσης, μοιάζει με δείκτη χεριού και σε πολλές περιπτώσεις φθάνει και ακριβώς κάτω από το ραχιαίο πτερύγιο. Ακόμη, στην κεφαλική περιοχή φέρει μια λεπτή λευκή λωρίδα που χωρίζει το σκουρόχρωμο ρύγχος από το μέτωπο. Χαρακτηριστική είναι μία λεπτή ζώνη που ξεκινά από τον οφθαλμό και καταλήγει στα θωρακικά πτερύγια που είναι γκριζόμαυρα. Το ουραίο πτερύγιο διαθέτει μια μικρή έλλειψη το μεσαίο τμήμα του, ενώ φέρει ιδιαίτερες γραμμώσεις. Στο πεδίο μπορούν εύκολα να μπερδευτούν με το κοινό δελφίνι (*Delphinus delphis*), επειδή μοιάζουν στο σχήμα και στο μέγεθος, μπορούν όμως εύκολα να διακριθούν από την χαρακτηριστική ζώνωση στις πλευρές τους. Είναι, επίσης, δυνατόν να θεωρηθούν ως *Lagenodelphis hosei*, όμως φέρουν μακρύτερο ρύγχος, μεγαλύτερο ραχιαίο πτερύγιο καθώς επίσης και διαφορετική ζώνωση.



Εικόνα 1.2. *Stenella coeruleoalba* (Πηγή ιδία)



Τα ζωνοδέλφια δείχνουν μόνο μια μικρή γεωγραφική διαφοροποίηση σε σκελετικά μορφομετρικά στοιχεία και λίγη έως καθόλου γεωγραφική διαφοροποίηση σε ότι αφορά τα χρωματικά πρότυπα. Ωστόσο, πολλοί ερευνητές έχουν εντοπίσει μικρές αλλά σημαντικές διαφορές στο σωματικό μέγεθος μεταξύ των τοπικών πληθυσμών του Β.Α Ατλαντικού, της Β.Δ και Ν.Δ Μεσογείου. (Rise, 1998). Στην έρευνα του Calzada & Aguilar (1995 & 1997) μελετήθηκε η διαφοροποίηση στο μέγιστο μέγεθος των ζωνοδέλφινων, σε διάφορες περιοχές της Μεσογείου. Τα ζωνοδέλφια της Ν. Μεσογείου βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από αυτό της Β. Μεσογείου. Η νότια ακτογραμμή χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη εποχικότητα και μικρότερη πυκνότητα κητωδών παράγοντες που πιθανόν αιτιολογούν την εμφάνιση μεγαλύτερων μεγίστων σωματικού μήκους σε έναν πληθυσμό. Η ποικιλομορφία που παρατηρήθηκε πιθανώς να υποδηλώνει διαφορετικούς πληθυσμούς, γενετικά απομονωμένους. Επίσης, διαφοροποίηση στο mtDNA υποδηλώνει ότι τα ζωνοδέλφια του Ν.Α Ατλαντικού αποτελούν διαφορετικό πληθυσμό από αυτό της Μεσογείου (Garcia-Martinez et al, 1999).

### 1.2.3. Διατροφή

Το ζωνοδέλφινο τρέφεται περιστασιακά, αλλά η διαίτά του περιλαμβάνει κυρίως κεφαλόποδα, οστρακόδερμα και ψάρια. Η διαίτά τους ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική τοποθεσία που βρίσκονται. Διάφορες έρευνες έδειξαν ότι το 50-100% του στομαχιού των ζωνοδέλφινων της Μεσογείου αποτελούνταν από κεφαλόποδα και μερικές φορές με ψάρια (Duguy et al, 1978; Raduan & Raga, 1982; Wurtz & Marrale, 1991; Blanco et al, 1994 & 1995), ενώ σε αυτά του Β.Α Ατλαντικού βρέθηκαν κυρίως ψάρια, όπως ο μπακαλιάρος (Desportes, 1985). Σε έρευνες που έγιναν στις ακτές της Ιαπωνίας και της Ν. Αφρικής το κυρίαρχο είδος ψαριού που βρέθηκε στα ζωνοδέλφια της περιοχής αυτής ήταν της οικογένειας Myctophidae (Miyazaki et al, 1973; Ross, 1984). Η πιο συχνή λεία ήταν καλαμάρια και σουπιές της οικογένειας Ommastrephidae and Histioteuthidae (Desportes, 1985; Pulcini et al, 1992; Wurtz & Marrale, 1991 & 1993).

Τα ζωνοδέλφια τρέφονται στις πελαγικές ή βενθοπελαγικές ζώνες, συχνά κοντά στην ηπειρωτική υφαλοκρηπίδα ή ακριβώς πιο έξω, στα ανοιχτά νερά (Desportes, 1985; Ross, 1984; Santos et al, 1993; Wurtz & Marrale, 1991). Η πλειοψηφία της λείας (74%-80%) έχουν φωσφορίζοντα όργανα, υποδεικνύοντας ότι τα δελφίνια τρέφονται πιθανόν σε

μεγάλα βάθη, πιθανόν καταδύοντας στα 200 με 700 m για να φτάσουν τη λεία τους. Πιθανόν μάλιστα να τρέφονται τη νύχτα για να εκμεταλλευτούν το πλεονέκτημα των ημερήσιων κατακόρυφων μεταναστεύσεων από είδη που αποτελούν τη λεία τους (Miyazaki et al, 1973; Ross, 1984; Wurtz & Marralle, 1991).

#### 1.2.4. Κατανομή-Γεωγραφική Εξάπλωση

Το ζωνοδέλφινο είναι ένα ωκεάνιο είδος που συνήθως βρίσκεται κοντά στις ακτές σε περιοχές όμως που τα νερά είναι βαθιά. Προτιμά ζεστά νερά και έτσι συναντάται παγκοσμίως σε όλα τα τροπικά και υποτροπικά νερά (Εικ. 1.3.), περιλαμβάνοντας τα νερά του Ειρηνικού, του Ινδικού και του Ατλαντικού Ωκεανού, τη Μεσόγειο και την Καραϊβική Θάλασσα και τον Β. Κόλπο του Μεξικού (Reeves et al, 2003). Προτιμούν επίσης και νερά με μεγάλες εποχιακές μεταβολές στην επιφανειακή θερμοκρασία και στα θερμοκλινή βάθη με εποχικές αναμειξεις (Cassens et al, 2005).

Τα όρια εξάπλωσης του κυμαίνονται βόρεια στον Ατλαντικό, την Ν. Γροιλανδία, την Ισλανδία, τις Φαρόες νήσοι και τη Δανία, συμπεριλαμβάνοντας και τη Μεσόγειο Θάλασσα, ενώ νότια φτάνει στο Buenos Aires, στη Δ. Αυστραλία, στη Ν. Ζηλανδία και στο Περού. Στον Ειρηνικό έχει εντοπιστεί στην Ιαπωνική Θάλασσα, το Hokkaido, σε γεωγραφικό πλάτος 40°N διαμέσου του Δ. Ειρηνικού και του Καναδά (Archer & Perrin 1999; Kasuva, 1999; Rice 1998; Baird et al, 1993; Reid, 2005).



Εικόνα 1.3. Distribution of *S. coerulealba*; warm temperate, subtropical and tropical waters around the world (Πηγή: Archer and Perrin, 1999 and Perrin et al, 1994)

Το ζωνοδέλφινο είναι το πιο διαδεδομένο δελφίνι της Μεσογείου και έχει στενά μελετηθεί στις ακτές της Ισπανίας, της Γαλλίας, της Ιταλίας και της Ελλάδας (Aguilar, 2000).

Στην Ελλάδα έχει εντοπιστεί στο Ιόνιο Πέλαγος, στο Μυρτώο, στο Σαρωνικό Κόλπο, στα Δωδεκάνησα, στην Κρήτη και στον Κορινθιακό Κόλπο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιοχή του Κορινθιακού κόλπου στην οποία παρατηρούνται υψηλές συχνότητες εντοπισμού του συγκεκριμένου είδους και συχνά μάλιστα παρατηρούνται σε μεικτά κοπάδια με άτομα του είδους *Delphinus delphis* και *Grampus griseus* (Podiadis et al, 2002).



Εικόνα 1.4. *Stenella coeruleoalba* (Πηγή ίδια)

#### 1.2.5. Μέγεθος πληθυσμού

Δεν υπάρχουν ακριβή στοιχεία για το σύνολο του μεγέθους του πληθυσμού τους στη Μεσογείο (Caspari, 2004). Σε παλιότερα όμως ερευνητικά ταξίδια (line-transect, 1991-92), που πραγματοποιήθηκαν στο δυτικό τμήμα της λεκάνης, το μέγεθος του πληθυσμού τους υπολογίστηκε να είναι της τάξης των 117.800 ατόμων (Beaubran et al, 1995). Ενώ άλλες έρευνες που έγιναν στη θάλασσα της Λιγυρίας έδειξαν ότι υπάρχουν περίπου 25.600 Ζωνοδέλφινα (Nortabartolo di Sciara et al, 1993). Από άλλες μελέτες (Perrin et al, 1994) ο πληθυσμός της Δ. Μεσογείου εκτιμάται στα 225.000 άτομα. Οι Kinzelbach (1997) και Aguilar (2000) χαρακτηρίζουν το είδος σπάνιο στην Α Μεσόγειο ωστόσο σήμερα αυτό είναι το πιο συχνά εντοπιζόμενο κητώδες των Ελληνικών



θαλασσών. Ακόμη η μέση σχετική πυκνότητα στις περιοχές της Valencia και της Murcia υπολογίστηκε σε 0,43 άτομα/ναυτικό μίλι (Gomez de Segura et al, 2003), ενώ στον Κορινθιακό κόλπο προσεγγίζει τα 0,85 άτομα/ναυτικό μίλι. Ο αριθμός τους σήμερα μειώνεται εξαιτίας της ρύπανσης των θαλασσών, την υποβάθμιση των ενδιαιτημάτων τους, την τυχαία σύλληψη τους από τα αλιευτικά εργαλεία, την εξάντληση των αλιευτικών αποθεμάτων, ενώ παλιότερα ο αριθμός του μειώθηκε σημαντικά εξαιτίας μιας θανάσιμης επιζωοτικής ασθένειας (Aguillar & Raga, 1993; Cardellicchio et al, 2000; Caurant et al, 2006; Cebrian, 1995; Notarbartolo di Sciara & Bearzi, 2002; Valscchi et al, 2004).

#### **1.2.6. Αναπαραγωγή**

Λίγα είναι γνωστά για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή του ζωνοδέλφινου. Η γεννητική του ωρίμανση παρατηρείται κυρίως το χειμώνα και στις αρχές του καλοκαιριού. Η κυοφορία διαρκεί 12 με 13 μήνες, κατά τη διάρκεια της οποίας η μέση ανάπτυξη του νεογνού είναι 0,29 cm τη μέρα. Στη Δ. Μεσόγειο, όπως και στον Δ. Ατλαντικό η κυοφορία διαρκεί 13 μήνες. Το μήκος κατά τη γέννηση του δελφινιού κυμαίνεται στα 92,5 cm και ο μέσο βάρος του στα 11,3 kg. Ο απογαλακτισμός διαρκεί περίπου 1,5 χρόνο. Μετά από αυτό το στάδιο, υπάρχει μία ταχεία αύξηση του μεγέθους και των δυο φύλων για τα δυο πρώτα χρόνια., με το μήκος τους να φτάνει τα 166 cm την πρώτη χρονιά και 188 κατά μέσο όρο cm τον δεύτερο χρόνο. Η σεξουαλική διαφοροποίηση ξεκινάει στο δεύτερο ή τρίτος έτος της ηλικίας τους (Gaspari, 2004).

#### **1.2.7. Βιολογία-Συμπεριφορά**

Το *Stenella coeruleoalba* είναι κυρίως πελαγικό είδος και απαντάται σε μεγάλες ομάδες δεκάδων, εκατοντάδων ή και χιλιάδων ατόμων. Στην Ελλάδα σχηματίζει ομάδες μέσου μεγέθους (μερικές δεκάδες άτομα, μέσο μέγεθος αγέλης στον Κορινθιακό κόλπο 20 άτομα, STDEV 15) με μεικτή σύνθεση (όσον αφορά ηλικία και φύλο). Στον ΒΑ Ατλαντικό παρατηρείται σε βάθη μεγαλύτερα των 1000 m μετά την ηπειρωτική κατωφέρεια (Perrin et al, 1994). Στο Γιβραλτάρ συναντάται σε βάθη μεγαλύτερα των 600 m ενώ στην Μεσόγειο οι Bourreau και Gannier (2003) μετρούν μέσο βάθος παρατηρήσεων τα 1760 m. Στα Ελληνικά ύδατα παρατηρείται κυρίως σε πελαγικές περιοχές με μεγάλο βάθος και απόσταση από τη ακτή αλλά και σε περιοχές με απότομο

ανάγλυφο όπου τα μεγάλα βάθη απαντώνται σε μικρή απόσταση από την ακτή όπως ο Κορινθιακός Κόλπος, Βόρεια των Σποράδων, Δυτικά των Ιονίων νησιών και Νότια της Κρήτης. (Frantzis & Herzing, 2002; Podiadis et al, 2002).

### **1.3. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

Η χρησιμοποίηση των μοριακών τεχνικών έχει αναπτυχθεί κατά πολύ τα τελευταία χρόνια λόγω τόσο της αλματώδους ανάπτυξης των ίδιων των μοριακών τεχνικών όσο και της σημασίας των γενετικών δεδομένων. Επίσης, εμφανίζονται με αυξανόμενο ρυθμό ολοένα και περισσότερες τεχνικές με στόχο την εύρεση της γενετικής ποικιλομορφίας σε επίπεδο DNA. Παρόλο το γεγονός ότι οι μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται πάνω από δύο δεκαετίες οι έρευνες είναι ακόμη σε πρωταρχικά στάδια. Η τεχνική των ισοενζύμων (isozymes-allozymes) είναι καλά καθιερωμένες στο χώρο και έχουν αποδειχθεί σημαντικές για την εκτίμηση παραμέτρων αρκετών ειδών. Από την άλλη μεριά όμως, η σημασία της πληροφορίας των γενετικών δεδομένων του DNA αποτελούν επιτακτική ανάγκη για περισσότερο επωφελούς έρευνας (Carvallo & Hauser, 1994).

#### **1.3.1. Μοριακές τεχνικές**

Με την πάροδο της επιστήμης και της τεχνολογίας των τελευταίων ετών και κυρίως έπειτα από τη μελέτη και τις περιγραφές των Watson και Crick (1953) για την ελικοειδή μορφή του μορίου του DNA, η οποία οριοθέτησε μια νέα εποχή στην κατανόηση και μελέτη των βιολογικών επιστημών και καθόρισε μια νέα οδό ανάπτυξης και εφαρμογής βιολογικών και μοριακών ανακαλύψεων και επιτευγμάτων. Οι επιστήμονες γνωρίζοντας τη μοριακή δομή του κληρονομικού μορίου μπορούν πλέον να διαχειριστούν και να αποσαφηνίσουν τις λειτουργίες και τις διεργασίες του DNA.

##### **1.3.1.1. Ηλεκτροφόρηση**

Η ηλεκτροφόρηση (electrophoresis) διαχωρίζει μακρομόρια (πρωτεΐνες ή κομμάτια νουκλεϊνικών οξέων) με βάση διαφορές κινητικότητας που οφείλονται στο μέγεθος τους, τη στερεοδιάταξή τους και το ολικό φορτίο τους. Εκχυλίσματα από έναν ή

περισσότερους οργανισμούς τοποθετούνται πάνω σε ένα πορώδες πήκτωμα (gel) στο οποίο εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό πεδίο. Αφού τα φορτισμένα μόρια κινηθούν κάτω από την επίδραση του πεδίου, η θέση τους αποκαλύπτεται με αντίδραση κάποιου υποστρώματος ή με ραδιογραφία εάν έχουν σημειωθεί με ραδιενεργά ισότοπα.

Η ηλεκτροφόρηση DNA είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει τμήματα DNA (DNA fragments) λόγω μεγέθους τους. Εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό πεδίο που αναγκάζει τα τμήματα αυτά να διατρέχουν στη πηκτή από τον αρνητικό στο θετικό πόλο, επειδή τα μόρια του DNA είναι αρνητικά φορτισμένα. Το αρνητικό αυτό φορτίο δημιουργείται εξαιτίας της φωσφορικής ομάδας στην αλυσίδα του DNA. Τα μεγαλύτερα τμήματα κινούνται πιο αργά σε σχέση με τα μικρά. Αφότου ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός τα μέρη των τμημάτων του DNA απεικονίζονται χρησιμοποιώντας μια χρωστική ουσία φθορισμού, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide). Η πηκτή εμφανίζει ζώνες (μπάντες) που αντιστοιχούν σε τμήματα DNA διαφορετικού μοριακού βάρους. Το μέγεθος των τμημάτων αναφέρονται συνήθως ως «νουκλεοτίδια», ή «ζεύγη βάσεων» ή «kb» (για 1.000 ζευγάρια βάσεων). Ο προσδιορισμός του μεγέθους των τμημάτων γίνεται με τη χρησιμοποίηση των DNA-ladders, όπου είναι τμήματα DNA γνωστών ζευγών βάσεων.

Οι τύποι των πηκτωμάτων που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα για την ηλεκτροφόρηση DNA είναι η αгарόζη (agarose), για σχετικά μεγάλα μόρια DNA, και η πολυακρυλαμίδα (polyacrylamide) για μικρά τμήματα ενισχυμένου DNA.

Μια ευαίσθητη μέθοδος χρώσης του DNA συνίσταται σε έκθεσή του σε μια χρωστική, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide), που προσδένεται στο DNA και φθορίζει κάτω από το υπεριώδες φως, ενώ μια ακόμη πιο ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης περιλαμβάνει την ενσωμάτωση ενός ραδιοϊσοτόπου στα μόρια του DNA πριν από την ηλεκτροφόρηση.

#### **1.3.1.2. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι μια σχετικά νέα μέθοδος που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών του DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες υλικού. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με απλό σχετικά τρόπο. Χάρη στην εξαιρετική ταχύτητα, ευαισθησία και εντυπωσιακή απλότητα, η αντίδραση της PCR αποτελεί σήμερα το πλέον βασικό και

ουσιαστικό εργαλείο στη διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας των διαφόρων πληθυσμών, αλλά και στις μελέτες της μοριακής γενετικής, γενικότερα.

Η αρχή της λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στη χρήση: μιας ειδικής DNA πολυμεράσης (της θερμοσταθερής Taq DNA πολυμεράσης που έχει απομονωθεί από το θερμοφίλο βακτήριο *Termus aquaticus* και αντέχει σε θερμοκρασίες έως 95°C), ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 20-30 βάσεων) που ονομάζονται εκκινητές (primers), διαλύματος ελευθέρων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοσιδίων (dNTP'S), διαλύματος MgCl<sub>2</sub>, ενός ειδικού διαλύματος για την Taq DNA πολυμεράση και στην παρουσία μιας ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας. Για την επιλογή των δυο κατάλληλων αλληλουχιών-αφετηριών πρέπει να είναι γνωστή η αλληλουχία των βάσεων των δύο άκρων του τμήματος του DNA, το οποίο επιθυμείτε να πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή θα είναι συμπληρωματική με την αλληλουχία ενός κλώνου της δίκλωνης έλικας του DNA στα δύο αντίθετα άκρα της επιλεγμένης περιοχής. Δεν είναι απαραίτητο να έχει απομονωθεί μόνο η αλληλουχία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί διότι αυτή μπορεί να καθοριστεί από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση.

Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR διακρίνεται σε τρεις φάσεις: τη μετουσίωση της διπλής έλικας (denaturation), την υβριδοποίηση (annealing) των ειδικών εκκινητών με τις απλές έλικες. Αμέσως κατόπιν (β'φάση) σε θερμοκρασία 50-65°C συνήθως (η θερμοκρασία αυτού του σταδίου εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών) τα ολιγονουκλεοτίδια αφετηρίες (εκκινητές) υβριδίζονται με τα αντίστοιχα συμπληρωματικά προς αυτά άκρα των δύο αλυσίδων. Στην τρίτη φάση η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 72°C, οπότε η πολυμεράση καταλύει την επέκταση του ολιγονουκλεοτιδίου σύμφωνα με την αλληλουχία που καθορίζει σαν καλούπι η κάθε μία από τις δυο έλικες. Η επέκταση γίνεται πάντοτε προς την πλευρά της 3' θέσης. Έτσι από τη μία διπλή έλικα δημιουργούνται δύο διπλές έλικες, στον αμέσως επόμενο κύκλο οι έλικες έχουν γίνει 4 και ο πολλαπλασιασμός συνεχίζεται εκθετικά για 25-35 κύκλους. Το αποτέλεσμα είναι ο πολλαπλασιασμός του τμήματος στόχου μέχρι μερικά εκατομμύρια φορές.

Σήμερα, η όλη διαδικασία της PCR έχει αυτοματοποιηθεί και με τα καινούργια και τελειότερα μηχανήματα μπορεί να τελειώσει σε λίγες μόνο ώρες. Η όλη διαδικασία των κύκλων της αυξομείωσης της θερμοκρασίας προγραμματίζεται από ένα μηχανήμα το οποίο ονομάζεται θερμικός κυκλοποιητής (PCR thermal cycler) και το οποίο έχει τη



δυνατότητα να αυξομειώνει την θερμοκρασία της αντίδρασης κάθε λίγα λεπτά ή δευτερόλεπτα, έτσι ώστε να επιτρέψει τη σύνθεση νέων τμημάτων DNA.

Μερικά προβλήματα που ενδέχεται να παρουσιαστούν κατά τον πολλαπλασιασμό είναι η μη ανίχνευση ή μη πολύ μικρή απόδοση του επιθυμητού προϊόντος, η παρουσία μη ειδικών ζωνών που οφείλεται σε λανθασμένη σύνδεση των εκκινητών, ο σχηματισμός από τους εκκινητές διμερών τα οποία συναγωνίζονται για πολλαπλασιασμό με το επιθυμητό προϊόν και η μόλυνση από άλλο DNA. Η τελευταία περίπτωση καθιστά επιτακτική την ανάγκη λήψεως αυστηρών προφυλάξεων.

Παρά τη σχετικά πρόσφατη εισαγωγή της PCR στη μοριακή βιολογία, η εφαρμογή της βρήκε άμεση ανταπόκριση σε ένα μεγάλο κύκλο εργασιών, όπως: στη διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας των οργανισμών είτε μέσω των σύγχρονων μοριακών δεικτών (οι περισσότεροι σήμερα μοριακοί δείκτες βασίζονται στην χρησιμοποίηση της PCR), είτε μέσω της άμεσης εύρεσης της πρωτοταγούς ακολουθίας των βάσεων του DNA, στον καθορισμό γενετικού αποτυπώματος, στην άμεση κλωνοποίηση γονιδιωμάτων ακολουθιών cDNA, στη διάγνωση γενετικών ασθενειών και στην αναγνώριση μολυσματικών παθογόνων ιών, παρασίτων και βακτηρίων.

### 1.3.2. Γενετικοί δείκτες

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες γενετικών δεικτών:

- α) Μορφολογικοί δείκτες (φαινοτυπικά γνωρίσματα)
- β) Δείκτες βασισμένοι σε πρωτεΐνες (Ισοένζυμα-αλλοένζυμα)
- γ) DNA δείκτες

Για να χαρακτηριστεί ένας δείκτης ως γενετικός δείκτης (genetic marker), θα πρέπει να δείχνει πολυμορφισμό μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού. Ο γενετικός δείκτης είναι οποιοδήποτε ζεύγος αλληλομόρφων που η κληρονομικότητα τους καθορίζεται από το είδος της διασταύρωσης. Ένας DNA δείκτης είναι τυπικά μια μικρή περιοχή του DNA που δείχνει μια πολυμορφική αλληλουχία διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους. Οι τεχνικές του υβριδισμού και της ενίσχυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώρισή τους.

#### 1.3.2.1. Πρωτεϊνική ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ήταν η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για την περιγραφή και ανάλυση γενετικών πληθυσμιακών παραμέτρων. Υπάρχουν δύο ομάδες ενζύμων, αυτές που έχουν την ίδια εξειδίκευση, που ονομάζονται γενικά ισοένζυμα (Markert & Moller, 1959) και τα αλλοένζυμα που αλληλόμορφα του ενζύμου κωδικοποιούνται από τον ίδιο γονιδιακό τόπο (Shaklee et al, 1990).

Η πιο κοινή τεχνική για τη διάκριση των διαφορετικών γενετικών τύπων των ενζύμων είναι η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος. Εκχυλίσματα από ορισμένα άτομα τοποθετούνται σε ένα πορώδες πηκτώμα, συνήθως αμύλου, στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό δυναμικό. Αν η αμινοξική σύσταση ενός ορισμένου ενζύμου ποικίλει και αν τα αμινοξέα τα οποία αλλάζουν έχουν διαφορετικά φορτία, τότε τα ένζυμα έχουν διαφορετικό ολικό φορτίο και κινούνται με διαφορετική ταχύτητα, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται μέσα στη πηκτή. Οι θέσεις τους στη συνέχεια βρίσκονται με εμβάπτιση του πηκτώματος μέσα σε διάλυμα του υποστρώματος, πάνω από το οποίο δρα το ένζυμο και με παρουσία χρωστικής που αντιδρά με το προϊόν της αντίδρασης ενζύμου - υποστρώματος. Με αυτό τον τρόπο οι διαφορετικοί γονότυποι αναγνωρίζονται από τις διαφορές στη θέση των ζωνών στη πηκτή.

Πλεονεκτήματα της πρωτεϊνικής ηλεκτροφόρησης είναι η γρήγορη ανάλυση των δειγμάτων και το χαμηλό κόστος των χημικών του εξοπλισμού που απαιτούνται.

### 1.3.2.2. Τεχνική RAPD

Η τεχνική RAPDs περιλαμβάνει τη χρήση τυχαίων εκκινητών στη PCR χωρίς να είναι γνωστή η αλληλουχία του υπό εξέταση DNA. Σε κάθε αντίδραση της PCR χρησιμοποιείται ένα είδος εκκινητή μήκους περίπου 10 ζευγών βάσεων. Ο εκκινητής λειτουργεί ταυτόχρονα και ως forward και ως reverse. Οι εκκινητές υβριδίζονται σε εκατοντάδες σημεία του γενόματος. Ωστόσο ενίσχυση (amplification) λαμβάνει χώρα μεταξύ σημείων που απέχουν λιγότερο από περίπου 2 kb (το μεγαλύτερο δυνατό μήκος για τα προϊόντα της PCR) (Allendorf & Luikart, 2007).

Στην τεχνική αυτή η ανίχνευση του πολυμορφισμού γίνεται με τυχαία ενίσχυση πολλών περιοχών στο γονιδίωμα με τη χρήση της PCR χρησιμοποιώντας μια απλή αλληλουχία 10 - 20 ζευγών βάσεων νουκλεοτιδίων (εκκινητές) αυθαίρετη μεν αλλά γνωστή αλληλουχία.. Τα προϊόντα αυτά της PCR τρέχουν σε πηκτή, συνήθως αгарόζης και αναλύονται. Είναι μια σχετικά απλή τεχνική για να πραγματοποιηθεί αλλά η

επαναληψιμότητα των παρατηρήσεων απαιτεί προσεκτικούς χειρισμούς των συνθηκών του πειράματος (Schierwater & Ender, 1993; Williams et al, 1993).

### 1.3.2.3. Τεχνική RFLP

Στην τεχνική του πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Restriction Fragments Length Polymorphism, RFLP) η παραλλακτικότητα λαμβάνει χώρα εντός ενός είδους στο μήκος τμημάτων του DNA δημιουργούμενο από ένα συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο (restriction enzyme). Ο πολυμορφισμός παρατηρείται όταν σε ένα πρότυπο περιορισμένων τμημάτων DNA συμβεί κάποια μετάλλαξη, έλλειψη ή προσθήκη βάσης στη συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού (Dowling et al, 1990). Σύμφωνα με τους Knox & Verspoor (1991) αναγνωρίστηκε ένα RFLP το οποίο είναι μοναδικό στη εκτροφή σολομών και προτείνουν ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην αποτίμηση πανμιξίας των διαφυγόντων εκτρεφόμενων σολομών της Νορβηγικής χερσονήσου με άτομα φυσικών πληθυσμών του σολομού της Σκωτίας.

### 1.3.2.4. Μιτοχονδριακό DNA

Οι πρώτες μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας σε επίπεδο DNA αφορούσαν το mtDNA, καθώς είναι ένα σχετικά μικρό κυκλικό μόριο το οποίο μπορεί να απομονωθεί ευκολότερα από το πυρηνικό DNA και απαντάται σε χιλιάδες αντίγραφα στο κύτταρο. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι στο mtDNA συσσωρεύονται πολυμορφισμοί με ταχύτερο ρυθμό από ότι στο πυρηνικό DNA. Το παραπάνω οφείλεται στους υψηλότερους ρυθμούς μετάλλαξης σε σχέση με το πυρηνικό DNA, εξ' αιτίας της απουσίας διορθωτικών μηχανισμών κατά την αντιγραφή του DNA, καθώς και λόγω του μικρότερου δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους ( $N_e$ ) (Liu & Cordes, 2004).

Από τεχνικής άποψης οι μοριακοί δείκτες του mtDNA είναι οι ίδιοι με αυτούς των RFLPs με μόνη διαφορά ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση το υπό μελέτη μόριο είναι το mtDNA ενώ στην άλλη περίπτωση στόχος είναι το πυρηνικό DNA. Πολλά χαρακτηριστικά του mtDNA το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο σε πολλές μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας. Το mtDNA είναι απλοειδές και στα ζωικά κύτταρα



κληρονομείται από το θηλυκό που σημαίνει ότι οι απόγονοι κληρονομούν έναν mtDNA γενότυπο. Είναι επίσης χρήσιμο στην κατασκευή φυλογενετικών δέντρων καθ' ότι δεν λαμβάνει χώρα ανασυνδυασμός κατά την αντιγραφή του σε αντίθεση με το πυρηνικό DNA.

#### 1.3.2.5. Μικροδορυφορική αλληλουχία (microsatellites)

Η μικροδορυφορική αλληλουχία είναι μία επαναλαμβανόμενη σύντομη ακολουθία (tandemly repetitive DNA sequence) που επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέσα στο γονιδίωμα ενός οργανισμού (Wright, 1994). Οι μονάδες της επανάληψης είναι μεταξύ ενός και έξι ζευγών βάσεων. Στη διεθνή βιβλιογραφία είναι γνωστοί ως:

- Tandem Simple Sequence Repeats (SSRs)
- Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs)
- Short Tandem Repeats (STR)
- Microsatellites

Βρίσκονται σε όλους τους ευκαριωτικούς οργανισμούς και επίσης στο γονιδίωμα των χλωροπλαστών στα φυτά και η κατανομή και συχνότητά τους διαφέρουν στις διάφορες ταξινομικές ομάδες. Χωρίζονται σε τρεις ομάδες ανάλογα με το εάν η αλληλουχία είναι συνεχής (Pure), ή συνδυασμένη (Compound) ή διακοπτόμενη (Interrupted):

Συνεχής:

- Συνδυασμένος:
- Διακοπτόμενος:

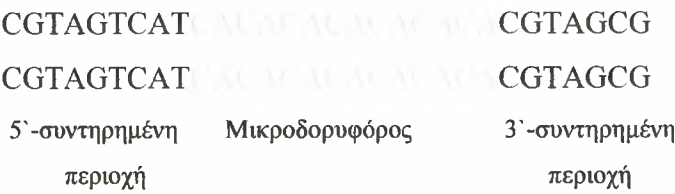
Τα αλληλόμορφα του μικροδορυφόρου είναι δείκτες συγκυριαρχίας και κληρονομούνται με τον Μεντελικό τρόπο. Επιτρέπεται έτσι, η ανάλυση τόσο των κυρίαρχων όσο και των υποτελών αλληλομόρφων (Wright, 1993), κάτι που με τις τεχνικές του μιτοχondριακού DNA (απλοειδής) και RAPD (μόνο κυρίαρχα αλληλόμορφα) είναι δύσκολο να εκτιμηθούν.

Η κατανομή των μικροδορυφόρων είναι τυχαία όταν λαμβάνοντας υπόψη όλο το γονιδίωμα. Οι μικροδορυφόροι μπορεί επίσης να βρεθούν μεταξύ συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος. Τα αλληλόμορφα σε ένα γονιδιακό τόπο καταγράφονται με

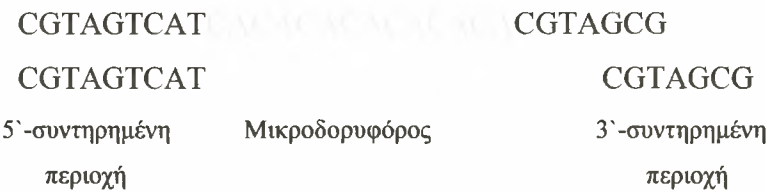
συγκεκριμένη ενίσχυση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης μέσω της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης (Pulido & Duyk, 1994).

Οι συντηρημένες περιοχές αποτελούν τα ζεύγη των primer που χρησιμοποιούνται στη PCR προκειμένου να ενισχυθεί η μικροδορυφορική αλληλουχία. Οι περιοχές αυτές είναι δυνατό να έχουν την ίδια αλληλουχία. Ένα ομόζυγο άτομο θα έχει τον ίδιο αριθμό επαναλήψεως σε αντίθεση με ένα ετερόζυγο άτομο, όπως φαίνεται παρακάτω:

**Ομόζυγο**



**Ετερόζυγο**



Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των μικροδορυφόρων βρίσκονται στο ότι είναι ιδιαίτερα πολυμορφικοί δείκτες ακόμα και σε μικρούς πληθυσμούς και σε είδη υπό εξαφάνιση και εμφανίζονται σε μεγάλη αφθονία στο γένομα. Τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού οφείλονται στους υψηλούς ρυθμούς μετάλλαξης που παρατηρούνται σε αυτές τις θέσεις. Οι μεταλλάξεις συνήθως οδηγούν σε αλλαγή του αριθμού των επαναλήψεων. Οι ρυθμοί μετάλλαξης υπολογίζεται ότι κυμαίνονται περίπου μια μετάλλαξη κάθε 1.000 ή 10.000 μειώσεις.

Η χρησιμότητα των μικροδορυφόρων διαφαίνεται λόγω ότι

- Το συνολικό μέγεθος της επαναλαμβανόμενης ακολουθίας είναι μικρό φτάνοντας τα 100 ζεύγη βάσεων, που επιτρέπει την παρουσία συντηρημένων περιοχών (flanking areas)
- Οι συντηρημένες περιοχές του μικροδορυφόρου είναι ένα απλό αντίγραφο γονομικού DNA και μπορούν εύκολα να σχεδιαστούν

- Η μετάλλαξη του μικροδορυφόρου σε υψηλό βαθμό, συνήθως από υπερενίσχυση ή παράλειψη μιας επανάληψης μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί (Moxon & Wills, 1999).

Λόγω του ότι οι μικροδορυφόροι είναι διάσπαρτοι εκτενώς στα ευκαριωτικά γονιδιώματα και αναλύονται με την τεχνική της PCR και δεν είναι απαραίτητη η θανάτωση του οργανισμού, χρησιμοποιούνται σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών, όπως forensics, στη διάγνωση ασθενειών, στη δομή πληθυσμών και στη διατήρηση των ειδών.

### 1.3.3. Χρήση μοριακών τεχνικών στο είδος *Stenella coeruleoalba*

Μελέτες πληθυσμιακής γενετικής του ζωνοδέλφινου (*Stenella coeruleoalba*) είναι ελάχιστες στη Μεσόγειο Θάλασσα περισσότερο λόγω έλλειψης δειγμάτων (Calzada & Aguilar, 1996; Notarbartolo di Sciara, 2002). Σύμφωνα με τον Bourret et al (2007) προτείνεται ότι, λόγω της στατιστικά σημαντικά απόκλισης από τον Νόμο των Hardy-Weinberg, οι πληθυσμοί της δυτικής Μεσογείου πιθανότητα να είναι περισσότερο διαιρεμένοι σε υποπληθυσμούς. Στη ίδια εργασία παρατηρήθηκε σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών της Μεσογείου και του Ειρηνικού Ωκεανού και μεταξύ της Μεσογείου και του Ατλαντικού Ωκεανού. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε κι η (Natoli, 2004). Επίσης σε έρευνά τους ο Calzada & Aguilar (1995) μελέτησαν τη διαφοροποίηση των ενήλικων δελφινιών της Μεσογείου, σε σχέση με το μέγεθος τους και βρήκαν ότι τα δελφίνια των νότιων περιοχών της Μεσογείου ήταν κατά πολύ μεγαλύτερα σε μήκος από αυτά των βορειότερων περιοχών. Οι Valsecchi et al (2004) έδειξαν ότι, κατά μέσο όρο όλα τα δείγματα ξεβρασμού έδειξαν υψηλά επίπεδα ενδογαμίας προτείνοντας ότι τα ζώα που πεθαίνουν από αρρώστιες οδηγούνται προς ξεβρασμό σε αντίθεση με αυτά που πεθαίνουν λόγω ηλικίας. Οι ξεβρασμοί του ζωνοδέλφινου έχουν αυξηθεί σημαντικά και έχουν μειωθεί οι πληθυσμοί σε πιο ζεστά νερά (MacLeod et al, 2005).

Οι Garcia-Martinez et al (1995) δεν παρατήρησαν καμία υποδιαίρεση στους πληθυσμούς του ζωνοδέλφινου στη Μεσόγειο Θάλασσα χρησιμοποιώντας μιτοχονδριακό DNA ως μοριακό δείκτη. Οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν ότι μεταξύ της Μεσογείου και του Ατλαντικού Ωκεανού δεν υπάρχει κανείς κοινός απλότυπος και η στατιστική ανάλυση έδειξε να υποστηρίζει την παρουσία δύο διαφορετικών πληθυσμών με ελάχιστες τιμές γονιδιακής ροής στο Στενό του Γιβραλτάρ. Αξίζει να σημειωθεί ότι, από προηγούμενες έρευνες θαλασσιών θηλαστικών η γονιδιακή ροή μπορεί να λαμβάνει

χώρα παρ' όλο που μελέτες του μιτοχονδριακού DNA δίνουν ισχυρή δομή μεταξύ των πληθυσμών (Valsecchi et al, 1997; Berube et al, 1998).

Άλλες γενετικές έρευνες έδειξαν ότι η πληθυσμιακή διαφοροποίηση δεν συνδέεται πάντα με την απόσταση, όταν οι γεωγραφικές αποστάσεις είναι σχετικά συνεχόμενες (Forbes & Boyd, 1997). Στην έρευνα του Hoelzel (1998) βρέθηκε ότι η γενετική σύνθεση των κητωδών δεν συσχετίζεται με γεωγραφικές αποστάσεις. Συχνά ενδοειδικές διαφορές σε κυνηγετικές συνήθειες και η διαφορετική χρησιμοποίηση του περιβάλλοντος, φαίνονται να είναι η σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη γενετική δομή των κητωδών (Hoelzel et al, 2002).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 46 δείγματα ζωνοδέλφινου τα οποία συλλέχθηκαν στον Κορινθιακό και Πατραϊκό Κόλπο, στις Β. Σποράδες, στην Κρήτη, στον Ατλαντικό και στην Λεβαντινή θάλασσα, στην περιοχή του Ισραήλ. Επίσης συλλέχθηκαν και 3 δείγματα κοινού δελφινιού, τα οποία βρέθηκαν στην περιοχή του Κορινθιακού και Πατραϊκού Κόλπου και μερικά από αυτά μάλιστα βρέθηκαν μέσα σε κοπάδια από ζωνοδέλφινια. Τα 20 δείγματα του Κορινθιακού και Πατραϊκού Κόλπου, όπως επίσης και τα δυο των Β. Σποράδων ήταν εξ' ολοκλήρου δείγματα βιοψίας που συλλέχθηκαν με βέλος βιοψίας σε ερευνητικό ταξίδι που πραγματοποιήθηκε το 2005 και στο οποίο έλαβα μέρος και το οποίο περιγράφεται παρακάτω. Τα 13 δείγματα που προήλθαν από τον Ατλαντικό Ωκεανό ήταν και αυτά από δελφίνια εξ' ολοκλήρου δείγματα βιοψίας που συλλέχθηκαν με βέλος βιοψίας σε προηγούμενο ερευνητικό ταξίδι και μας στάλθηκαν στο εργαστήριο για περαιτέρω ανάλυση και σύγκριση με τα δικά μας δείγματα του Κορινθιακού και Πατραϊκού και των Β. Σποράδων. Ύστερα από ανακοίνωση σε όλα τα λιμεναρχεία της Ελλάδος για την τυχόν εύρεση ξεβρασμένων δελφινιών, εντοπίστηκε ένα στην περιοχή του Ηρακλείου της Κρήτης από το οποίο επίσης συλλέχθηκε δείγμα και στάλθηκε στο εργαστήριο. Τέλος, τα 7 δείγματα της Λεβαντινής Θάλασσας προέρχονταν από δελφίνια ξεβρασμένα στην περιοχή κοντά στο Ισραήλ τα οποία μας στάλθηκαν στο εργαστήριο για περαιτέρω ανάλυση και σύγκριση με τα δικά μας.

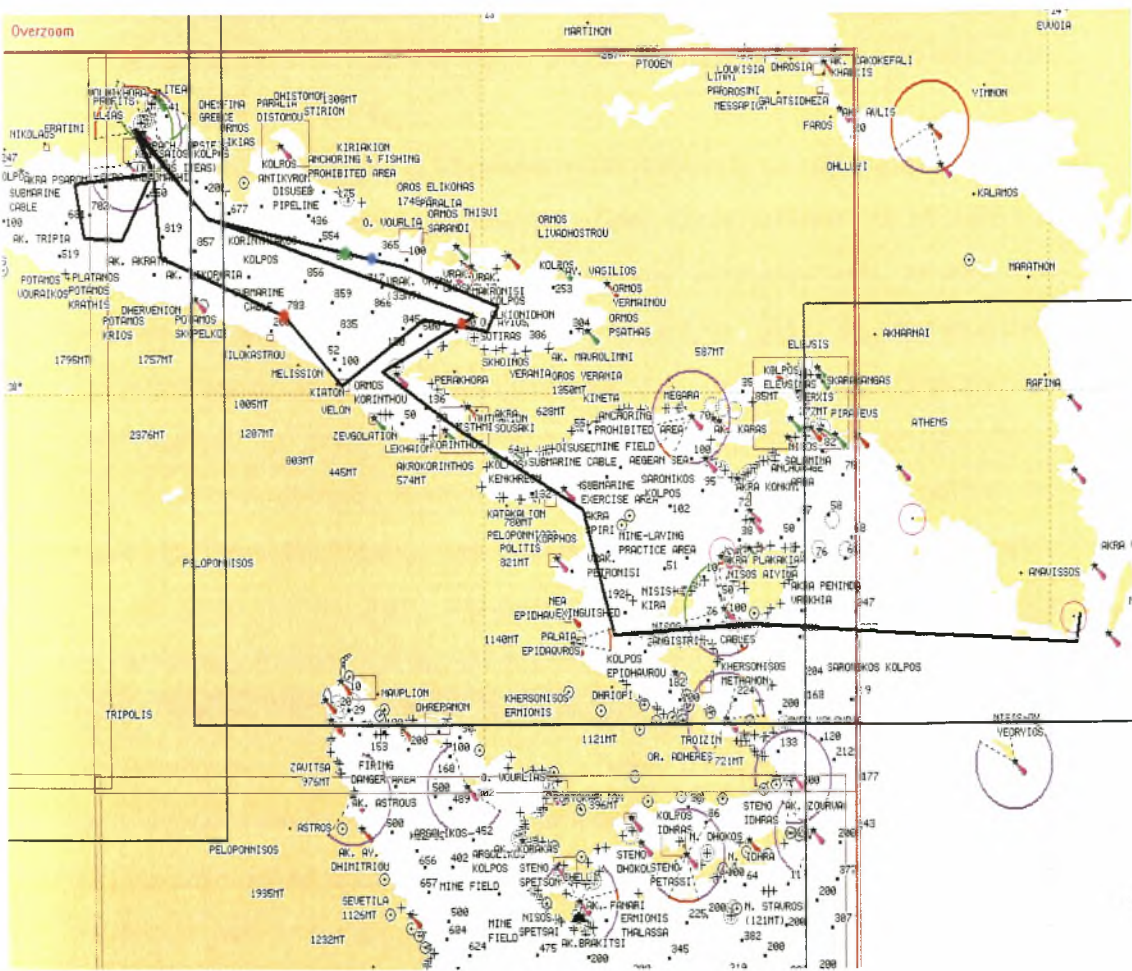
#### 2.1.1 Περιοχές συλλογής και επεξεργασία δειγμάτων

Για τη συλλογή των απαραίτητων στοιχείων και δειγμάτων το φθινόπωρο του 2005 πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το ερευνητικό πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II, ερευνητικό ταξίδι με ένα ιστιοφόρο καταμαράν (Εικ. 2.1.1.), κατά τη διάρκεια του οποίου συγκεντρώθηκαν στοιχεία για τη μελέτη της πληθυσμιακής γενετικής δομής του ζωνοδέλφινου *Stenella coerulealba* στις ελληνικές θάλασσες, με ιδιαίτερη προσοχή την περιοχή του Πατραϊκού και Κορινθιακού Κόλπου, που αποτελούσε μία από περιοχές μελέτης αυτού του προγράμματος. Η πορεία του ταξιδιού και οι περιοχές δειγματοληψίας φαίνονται στον Χάρτη 1.





Εικόνα 2.1.1. Ιστιοφόρο καταμαράν (ιδία πηγή)



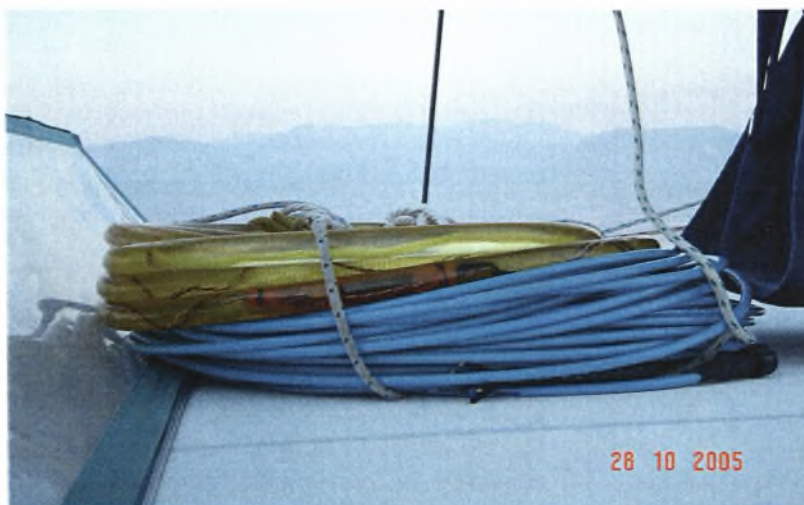
Χάρτης 1. Πορεία ερευνητικού ταξιδιού (ιδία πηγή)

Η ερευνητική αυτή αποστολή διάρκεσε περίπου ένα μήνα από τις 28 Σεπτεμβρίου έως τις 2 Νοεμβρίου του 2005. Κατά τη διάρκεια του ταξιδιού πραγματοποιήθηκαν:

- Οπτική παρατήρηση για τον εντοπισμό και την καταγραφή όλων των ειδών που συναντήθηκαν. Τα δεδομένα της μελέτης συλλέγονταν με βάση τη μέθοδο της εκτίμησης των συχνοτήτων των ζώων (Notarbartolo di Sciara et al, 1993; Politi et al, 1991, η οποία δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα για την σχετική αφθονία των ζώων στην εξεταζόμενη περιοχή. Χρησιμοποιώντας κιάλια (7X50) σε εναλλαγή με γυμνό οφθαλμό, μέλη του πληρώματος σάρωναν διαρκώς την επιφάνεια της θάλασσας για οτιδήποτε μπορούσε να προδίδει την παρουσία κάποιου οργανισμού (αφροί, πτερύγιο κλπ). Το σκάφος ταξίδευε σε ευθεία γραμμή μέχρις ότου εντοπιστούν δελφίνια, όπου παρέκκλινε προς την πορεία τους για να γίνει η εξακρίβωση του είδους, του αριθμού, της ηλικίας, της συμπεριφοράς τους και για τη δειγματοληψία και φωτογράφιση του είδους.
- Τεχνικές φωτοαναγνώρισης, αποτύπωση με ψηφιακές φωτογραφικές μηχανές μοναδικών γνωρισμάτων σε άτομα του είδους. Πρόκειται για μια αβλαβή και ανώδυνη τεχνική μελέτης. Η εφαρμογή της βασίζεται στο γεγονός ότι σημαντικό ποσοστό ατόμων κητωδών φέρει ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά και μοναδικά σημάδια τα οποία είναι δυνατόν να αποτυπωθούν σε φωτογραφικό φιλμ. Τα σημάδια που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι φυσικά (γενετικά χαρακτηριστικά) ή επίκτητα (σημάδια από παράσιτα, θηρευτές, δίχτυα, από συγκρούσεις μεταξύ του ίδιου είδους, αλλά και με άλλα είδη). Αυτό επιτρέπει την αναγνώριση και ταυτοποίηση μεμονωμένων ατόμων καθώς και την παρακολούθησή τους μέσω διαδοχικών παρατηρήσεων. Η καταγραφή αυτών των παρατηρήσεων και ο εντοπισμός των αναγνωρισμένων ατόμων μπορεί να δώσει στοιχεία για μεταναστεύσεις, την κοινωνική δομή και το μέγεθος πληθυσμού.
- Ακουστική παρατήρηση, καταμέτρηση και ηχογράφιση όλων των ομάδων δελφινιών που εντοπίστηκαν, με τη χρήση υδροφώνου (Εικ. 2.1.2.) και ειδικού λογισμικού. Το υδρόφωνο που χρησιμοποιήθηκε είναι μια στερεοφωνική υποβρύχια μικροφωνική διάταξη που ρυμουλκούνταν διαρκώς πίσω από το σκάφος. Τα σήματα που λαμβάνονταν ακούγονταν από μέλη του



πληρώματος ενισχύονταν φιλτράρονταν, ενώ παράλληλα γινόταν επεξεργασία στον Η/Υ. Από τους ήχους αυτούς ήταν δυνατή η αναγνώριση του είδους των δελφινιών, η κατεύθυνση τους, η σχετικής τους απόσταση και ο αριθμός των δελφινιών.



**Εικόνα 2.1.2.** Υδρόφωνο (ιδία πηγή)

- Συλλογή και συντήρηση δειγμάτων δέρματος και μετέπειτα γενετική τους ανάλυση στο εργαστήριο. Η δειγματοληψία έγινε με τη χρήση βέλους βιοψίας από δελφίνια που κολυπούσαν μπροστά στην πλώρη του σκάφους (Εικ. 2.1.3.). Το μέγεθος του βέλους ήταν τέτοιο ώστε να αποφεύγεται ο επικίνδυνος τραυματισμός του οργανισμού. Η ποσότητα του δείγματος επιδερμίδας που συλλεγόταν ήταν τόσο μικρή ώστε να μην προκαλεί πληγή στον οργανισμό και να είναι δυνατή η επούλωση της εντός λίγων ημερών. Πραγματικά εκτός από το λίγο ξάφνιασμα του ζώου λόγω του θορύβου που έκανε το βέλος πέφτοντας στο νερό, παρατηρήθηκε ότι όλα τα δελφίνια από τα οποία συλλέχθηκε δείγμα, μετά τη δειγματοληψία συνέχιζαν να ταξιδεύουν προπορεύοντας το σκάφος, δείχνοντας με αυτόν τον τρόπο την ευχαρίστηση τους.

Το δείγμα δέρματος συλλεγόταν κάθε φορά από την πρόσθια περιοχή του ραχιαίου πτερυγίου. Στη συνέχεια με αποστειρωμένη λεπίδα το δείγμα τοποθετούνταν σε αριθμημένο σωλήνα του 1,7 ml που περιείχε διάλυμα DMSO 20% (Εικ. 2.1.4.). Σε κάθε Ependorf αναγραφόταν η κωδικοποίηση του δείγματος που αναφερόταν στην τοποθεσία και η ημερομηνία. Το βέλος βιοψίας και η λεπίδα πριν από κάθε συλλογή

αποστειρώνονταν με διάλυμα αιθανόλης 100%. Για την εργασία αυτή απασχολούνταν ένα άτομο ανά βήμα. Όλα τα δείγματα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσονταν στο σκάφος μέχρις ότου μεταφερθούν στο εργαστήριο, όπου διατηρούνταν -86 °C για την περαιτέρω επεξεργασία τους.



Εικόνα 2.1.3. Δειγματοληψία *Stenella coeruleoalba* (ιδία πηγή)

Τα δείγματα προέρχονται από 5 πληθυσμούς. Το μέγεθος των πληθυσμών κυμαίνονται από 3 έως και 20 άτομα. Οι περιοχές από τις οποίες προέρχονται οι πληθυσμοί ήταν ο Ατλαντικός, ο Κορινθιακός- Πατραϊκός Κόλπος, το Αιγαίο (Σποράδες, Κρήτη), η Λεβαντινή Θάλασσα (κοντά στο Ισραήλ) και από τον Κορινθιακό-Πατραϊκό το είδος *Delphinus delphis*. Στον παρακάτω Πίνακα (2.1.1.) φαίνονται οι περιοχές της δειγματοληψίας και ο αριθμός των ατόμων κάθε πληθυσμού.

Πίνακας 2.1.1. Ονομασία, αλληλουχία και επανάληψη στο κλώνο των Primer

Περιοχές δειγματοληψίας	Αριθμός ατόμων
Ατλαντικός	13
Κορινθιακός-Πατραϊκός	20
Αιγαίο	3
Λεβαντινή Θάλασσα	7
<i>Delphinus delphis</i>	3



**Εικόνα 2.1.4.** Τοποθέτηση δείγματος σε αποστειρωμένο Eppendorf (ιδία πηγή)

### 2.1.2 Εξαγωγή DNA

Η απομόνωση του γενομικού DNA γίνεται με διάφορες τεχνικές όπου όλες αποσκοπούν πρώτα στην αφαίρεση των πρωτεϊνών και ύστερα στην αφαίρεση των παραπροϊόντων του DNA. Ακολουθήθηκε η τεχνική της φαινόλης/χλωροφορμίου (Sambrook et al, 1986).

Για την αφαίρεση ενός κομματιού ιστού από κάθε άτομο χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα εργαλεία όπως νυστέρι, λαβίδα, καθώς και αποσταγμένο νερό. Ο ιστός ήταν από το εσωτερικό και το εξωτερικό της επιδερμίδα του δελφινιού. Ο ιστός από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο Eppendorf (Biologix, BMT-15N).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αποτελείται από τα παρακάτω βήματα (Exadactylos, 1997):

1. Το δείγμα του ιστού τοποθετείται σε αποστειρωμένο eppendorf.
2. Στο Eppendorf προστίθεται:
  - a. 500μl διαλύματος TNE (10 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, pH 8)
  - b. 50 μl Tris-HCl, pH 8
  - c. 25 μl διαλύματος SDS περιεκτικότητας 25%
  - d. 20 μl Πρωτεϊνάση K (Proteinase K) συγκέντρωσης 10 mg/l.  
όπου και ανακινούνται ελαφρώς.

3. Επωάζονται σε υδατόλουτρο (Memmert) στους 55° C για 12 ώρες περίπου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται το μαλάκωμα του ιστού και η απομάκρυνση των πρωτεϊνών.
4. Στη συνέχεια γίνεται η λιοτρίβιση του ιστού μέσα στο μίγμα με έμβολο και ακολουθεί επώαση του σε κλίβανο (WTB Binder, Labortechnik GmbH) σε θερμοκρασία 55° C για 2 ώρες με σκοπό την απομάκρυνση των πρωτεϊνών.
5. Μετά το τέλος της επώασης και αφού παραμένει το δείγμα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προστίθενται 600μl φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 25:24:1 για την απομάκρυνση πυρηνικών οξέων και την δέσμευση των πρωτεϊνών.
6. Ανακινείται ελαφρώς και ύστερα φυγοκεντρείται (Hettich, MIKRO 12-24 UNIVERSAL) για 10 λεπτά σε 13.000 στροφές σε θερμοκρασία 4° C για να διαχωριστούν οι 2 φάσεις.
7. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο (υδατική φάση) με πιπέτα και τοποθετείται σε δεύτερο Eppendorf.
8. Στο νέο Eppendorf προστίθεται 600μl Χλωροφόρμιο-Ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1 και ακολουθεί ελαφρά ανάδευση. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των υπολειμμάτων φαινόλης.
9. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές
10. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης αφαιρείται ξανά το υπερκείμενο και τοποθετείται σε τρίτο Eppendorff στο οποίο προστίθεται 1 ml καθαρής αιθανόλης (100%).
11. Έπειτα προστίθεται 6 μl Sodium Acetate συγκέντρωσης 3M και το Eppendorf τοποθετείται σε καταψύκτη στους -20° C για 30 λεπτά για την δέσμευση του DNA σε στερεά μορφή.
12. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, ακολουθεί ξανά φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 13000 στροφές.
13. Στο κάτω μέρος του Eppendorf παρατηρείται ένα λευκού χρώματος ίζημα (pellet).
14. Μετά την προσεκτική αφαίρεση της αλκοόλης (προσέχοντας να μην πέσει το pellet) προστίθεται 200 μl κρύας αιθανόλης (4 °C) περιεκτικότητας 70 % και φυγοκεντρείται ξανά για 5 λεπτά στις 13000 στροφές.

15. Έπειτα η αιθανόλη αφαιρείται τελείως και το Eppendorf τοποθετείται με ανοικτό το πώμα στον κλίβανο επώσεως για περίπου 20 λεπτά στους 40° C για να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης.
16. Μετά την επώαση προστίθεται 50 μl υπερστειωμένο νερό (Gibco ultra-sterilized water) και τοποθετείται στον καταψύκτη στους -20° C, έως ότου αναλυθεί.  
(Όλα τα παραπάνω χημικά ήταν της εταιρείας Scharlau).

### 2.1.3 Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ανίχνευση της ποιότητας και ποσότητας του απομονωμένου DNA επιτεύχθηκε ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Invitrogen) 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1%.

Το διάλυμα του TAE 1% αραιωνόταν από ένα stock buffer TAE 50% (242 g Tris-HCl, 57 ml Acetic Acid, 0,05 M EDTA pH 8).

Για την πηκτή της αγαρόζης (Sambrook et al, 1986) 2 g στερεής αγαρόζης προστέθηκαν σε 100 ml διαλύματος TAE 1%. Η διάλυση της πραγματοποιήθηκε με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων (KENWOOD microwave) για 2 λεπτά, στους 90°C. Αμέσως μετά, και αφού η κωνική φιάλη διαβρέχονταν με κρύο νερό έτσι ώστε η θερμοκρασία του διαλύματος να κατέβει περίπου στους 40-50° C, προστέθηκαν 3 μl Βρωμιούχου Αιθιδίου 1% (Scharlau) ανακινούνταν ελαφρά. Έπειτα το διάλυμα τοποθετούνταν σε τετράγωνο Plexiglas, μήκους 10 cm. Το Plexiglas είχε 2 εσοχές (1 cm) εκατέρωθεν του πάνω μέρους των δύο πλευρικών τοιχωμάτων του όπου εφαρμόζαν 2 «χτενάκια» για τη δημιουργία των υποδοχών (πηγάδια). Με το κάθε χτενάκι ήταν δυνατή η δημιουργία 16 θέσεων όγκου 14 μl. Οι άλλες δύο πλευρές δεν είχαν τοιχώματα και καλύπτονταν με χαρτοταινία για την στεγανοποίηση του μίγματος. Μετά από 20 περίπου λεπτά είχε δημιουργηθεί η πηκτή με τις μορφοποιημένες υποδοχές-θέσεις μετά από αφαίρεση των χτενιών.

Ο συνολικός όγκος κάθε δείγματος που φορτώνονταν με την τεχνική "by pipetting" ήταν 12 μl, τα οποία αποτελούνταν από 2 μl DNA, 2 μl χρωστικής (Blue-bromophenol, Invitrogen) και 8 μl απεσταγμένου νερού. Η χρησιμοποίηση της χρωστικής ήταν απαραίτητη για τον διαχωρισμό των προϊόντων. Αφού το Plexiglas τοποθετούνταν μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθέτονταν το ρυθμιστικό

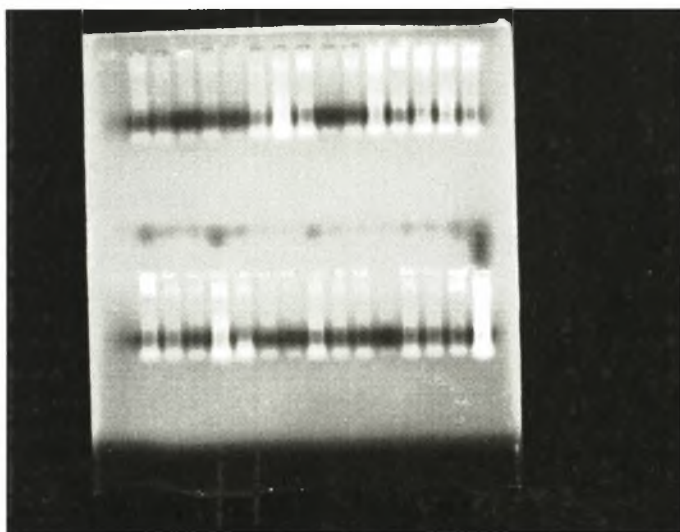


διαλυμα πραγματοποιούνταν η φόρτωση των δειγμάτων. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση ήταν TAE 1%.

Στη συνέχεια γινόταν παροχή τάσης (60 volt) από το τροφοδοτικό (CONSORT E143) στη συσκευή (SCIE-PLAS) για 20 λεπτά. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετούνταν σε φωτογραφική μηχανή (DNR, Mini Bis Bio-Imaging Systems) υπό υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

Έπειτα γινόταν εξέταση ύπαρξης του DNA, μέσω της φωτογραφικής απεικόνισης (Εικ. 2.1.5.) και όπου αυτό ήταν θολό, λόγω ύπαρξης παραπροϊόντων ή μικρής ποσότητας του, πραγματοποιούνταν επανάληψη της απομόνωσης σε αυτά τα άτομα.

Μετά την ηλεκτροφόρηση, το απομονωμένο DNA κάθε δείγματος αραιώνονταν 1:100 και έπειτα χρησιμοποιούνταν για την μέθοδο της PCR.



Εικόνα 2.1.5. Φωτογραφική απεικόνιση ποιότητας και ποσότητας DNA (Ιδία πηγή)

#### 2.1.4 Επιλογή μικροδορυφορικών τόπων

Εξετάστηκαν 11 ζεύγη εκκινητών μικροδορυφορικής αλληλουχίας (microsatellite Primers) με κωδική ονομασία KWM1b, KWM 2a, KWM 2b, KWM 9b, KWM 12a (Hoelzel et al, 1998), D08, D14, D22, D28 (Shinohara et al, 1997), Tex Vet 5, Tex Vet 7 (Rooney et al, 1999). Η αλληλουχία τους αναφέρεται στον Πίνακα 2.1.2.

Από τους παραπάνω εκκινητές, αυτοί που επιτυχώς αναπαράχθηκαν στα άτομα του ζωνοδέλφινου αυτού του πειράματος ήταν οι KWM 2b, KWM 9b, KWM12a, D08, και ο Tex Vet 7.

Όλες οι διεργασίες για τη μελέτη και την γονοτύπιση των μικροδορυφορικών τόπων και αλληλουχιών πραγματοποιήθηκαν εργαστηριακά στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών Κρήτης.

Οι παρακάτω εκκινητές μελετήθηκαν εργαστηριακά με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή PCR (MJ Research, Base Station). Οι συνθήκες της PCR καθορίστηκαν με πειραματικό σχεδιασμό, αλλάζοντας κάθε φορά μια συνθήκη και έχοντας σαν πρότυπο τις συνθήκες που εφαρμόστηκαν κατά τη μελέτη των μικροδορυφορικών τόπων στο DNA του μελανουριού (*Oblada melanura* L.), (Γκάφας, 2005).



**Πίνακας 2.1.2.** Ονομασία, αλληλουχία και επανάληψη στο κλώνο των Primer

Κωδικός Primer	Αλληλουχία	Επανάληψη στον κλώνο	Αλληλομορφικές συχνότητες	Χρώμα φθορισμού
KWM1b	F:TAAGAACCTAAATTTGGC R:TGTTGGGTCTGATAAATG		170-210	HEX
KWM 2a	F:GCTGTGAAAAATTAATGT R:CACTGTGGACAAATGTAA		130-170	HEX
KWM 2b	F:AGGGTATAAGTGTTAAGG R:CAACCTTATTTGGATTTC		150-190	FAM
KWM9b	F:TGTCACCAGGCAGGACCC R:GGGAGGGG-CATGTTTCTG		140-155	FAM
KWM12a	F:CCATACAATCCAGCAGTC R:CACTGCAGAATGATGACC		150-190	ROX
D08	F:GAT CCA TCA TAT TGT CAA GTT R:TCC TGG GTG ATG AGT CTT C	(TG) <sub>18</sub>	103	ROX
D14	F:CTA GTC ATA TAG TGG TAA CAC R:GTT TTG TTG AAA GGA GGT CTC	(AC) <sub>16</sub>	120	FAM
D22	F:GGA AAT GCT CTG AGA AGG TC R:CCA GAG CAC CTA TGT GGA C	(CA) <sub>3</sub> -TA- (CA) <sub>21</sub>	135	HEX
D28	F:ATC CCT TTT CTA AGT CAA AGG R:TAT TAC CTC TCA CTT TTT AGG	(CA) <sub>24</sub>	145	Tamra
Tex Vet 5	F:GAT TGT GCA AAT GGA GAC A R:TTG AGA TGA CTC CTG TGG G		236-260	ROX
Tex Vet 7	F:TGCACTGTAGGGTGTTCAGCAG R:CTTAATTGGGGGCGATTTCAC	(CA) <sub>12</sub>	150-170	Tamra



Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εκκινητές (primers), δηλαδή ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλετιδίων, διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTP's), διάλυμα MgCl<sub>2</sub>, μια θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση, ειδικό διάλυμα (Buffer), μία ποσότητα DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας και τέλος μια ποσότητα υπερστειωμένου νερού (H<sub>2</sub>O). Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν (Πίν. 2.1.3).

**Πίνακας 2.1.3.** Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR

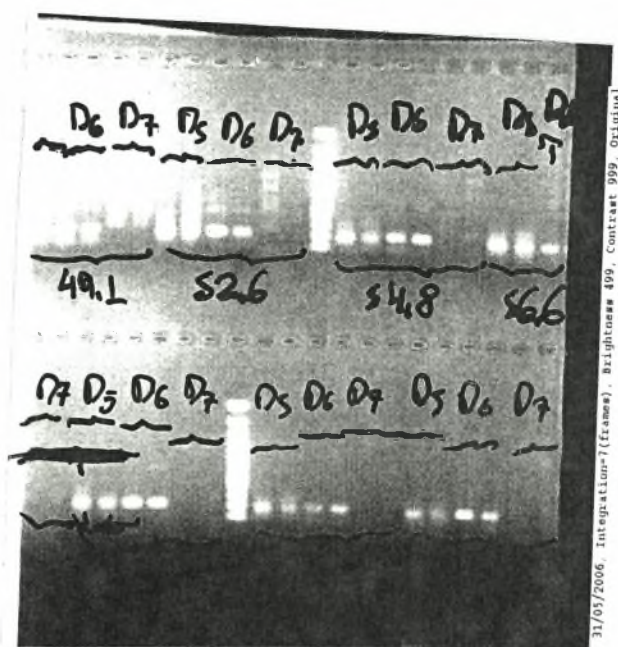
Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
DNA	1 µl
Buffer	1 µl (10X)
MgCl <sub>2</sub>	0,6 µl (25 mM)
DNTP's	0,2 µl (10mM)
Primer (Re+Fw)	1,2 µl (0,6+0,6) (10µM)
Taq-polymerase	0,15 µl (5U/ µl)
H <sub>2</sub> O	5,85 µl

Οι συνθήκες των θερμοκρασιακών κύκλων της αρχικής αποδιάταξης (first denaturation), των τριών σταδίων αποδιάταξη (denaturation)–επαναδιάταξης (annealing) – επιμήκυνσης (extention) και της τελικής επιμήκυνσης (final extention) φαίνονται στον Πίνακα 2.1.4.

**Πίνακας 2.1.4.** Συνθήκες θερμοκρασιακών κύκλων της PCR

Στάδια PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95	3 min	1
Αποδιάταξη	95	1 min	30
Επαναδιάταξη	48 – 59 °C	50 sec	
Επιμήκυνση	72	50 sec	
Τελική επιμήκυνση	72	10 min	1

Η θερμοκρασία επαναδιάταξης είναι συγκεκριμένη για κάθε primer και ορίστηκε έπειτα από την εφαρμογή της τεχνικής gradient της PCR. Η gradient περιελάμβανε τις εξής θερμοκρασίες : 49,1°C, 52,6°C, 54,8°C, 56,6°C, 57,9°C, 58,8°C, 59,8°C. Για την εφαρμογή της τεχνικής επιλέχθηκαν 2 απομονωμένα δείγματα, για την καλύτερη αξιοπιστία της μεθόδου. Στην παρακάτω εικόνα (Εικ. 2.1.6.) διακρίνεται το αποτέλεσμα μιας εφαρμογής gradient σε 2 δείγματα, για τους primers KWM12a, D08 και D14 στις διάφορες θερμοκρασίες. Από τους οποίους ο KWM12a αντέδρασε καλύτερα στη θερμοκρασία των 52°C, ο D08 στη θερμοκρασία των 58°C, ενώ ο D14 δεν αντέδρασε. Η απεικόνιση είναι αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης. Το μίγμα για την ηλεκτροφόρηση είχε όγκο 12 μl: 10 μl προϊόν PCR και 2 μl χρωστικής (Blue-bromophenol). Επίσης, κατά το φόρτωμα των δειγμάτων στα πηγάδια, φορτώνονταν και ένας μάρτυρας για την εξακρίβωση της σωστής λειτουργίας της.



Εικόνα 2.1.6. Απεικόνιση της τεχνικής gradient, σε πηκτή αгарόζης (Ιδία πηγή).

Έπειτα από εφαρμογή της παραπάνω τεχνικής για όλους τους primers, και έπειτα από την απεικόνισή τους, επιλέχθηκαν οι παρακάτω θερμοκρασίες επαναδιάταξης, όπως φαίνονται στον Πίνακα 2.1.5.

**Πίνακας 2.1.5. Θερμοκρασία επαναδιάταξης PCR**

<b>Κωδικός Primer</b>	<b>Θερμοκρασία Επαναδιάταξης</b>
KWM2b	52 °C
KWM9b	58°C
KWM12a	52 °C
D08	58 °C
Tex Vet 7	58 °C

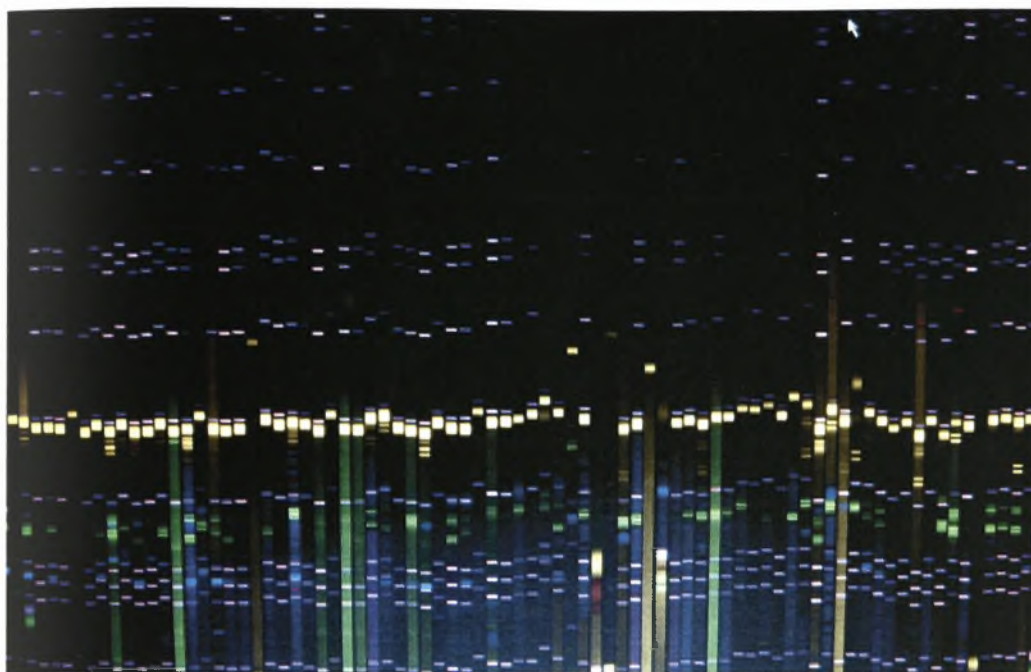
Κατά τη παρασκευή του μίγματος της PCR χρησιμοποιήθηκε ο ένας εκ των Forward – Reverse, του κάθε Primer, σημασμένος. Οι συγκεκριμένοι που γονοτυπήθηκαν ήταν βαμμένοι με τα εξής χρώματα:

- KWM2b FAM - μπλε χρώματος
- KWM9b FAM - μπλε χρώματος
- KWM12a ROX -κόκκινου χρώματος
- D08 ROX - κόκκινου χρώματος
- Tex Vet 7 TAM - μαύρου χρώματος

Μετά το τέλος της PCR, οι πλάκες, οι οποίες πλέον περιέχουν τα πιστά αντίγραφα κάθε δείγματος, φυλάσσονταν σε καταψύκτη στους -20 °C μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους.

Για το διαχωρισμό των βάσεων χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6% (MJ Research) με οριζόντια ηλεκτροφόρηση. Το μίγμα (RUN) της ηλεκτροφόρησης είχε όγκο 5 μl: 1 μl προϊόν PCR, 3,9 μl φορμαμίδιο και 0,1 μl μάρτυρα. Στη συνέχεια το μίγμα αποδιαταζόταν για 5 λεπτά στους 95 °C και φυλαζόταν σε πάγο μέχρι την αυτόματη φόρτωσή του στη πηκτή.

Με τη παροχή υψηλή τάσης (4000 volts) το μίγμα (RUN) εισέρχονταν στη πηκτή και με τη χρήση οπτικής ίνας laser γινόταν η αποτύπωση των βάσεων. Η εικόνα που έβγαине ως τελικό αποτέλεσμα (Εικ. 2.1.7.) επεξεργάζονταν με το πρόγραμμα STRAND 2.3.0.48. όπου στη συνέχεια γινόταν η μέτρηση των βάσεων των αλληλομόρφων.



Εικόνα 2.1.7. Χρωματική απεικόνιση των βάσεων βάσεων των αλληλομόρφων (ίδια πηγή)

### 2.1.5 Στατιστική ανάλυση

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων, η αναμενόμενη και η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία κατά Hardy Weinberg, ο δείκτης γονιδιακής ροής  $N_m$ , το test  $\chi^2$  και το test της πιθανότητας  $P$  υπολογίστηκαν με το λογισμικό πακέτο GenePop 3.4 (Raymond and Rousset, 1995). Οι αποκλίσεις από τον νόμο του Hardy-Weinberg ( $P_{0.99}$ ) εξετάσθηκε σύμφωνα με τους Guo και Thompson (1992). Ο δείκτης  $N_m$  υπολογίσθηκε σύμφωνα με τον Slatkin (1985). Τέλος, για την εκτίμηση της πιθανότητας  $P$  χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Markov ενώ για το test  $\chi^2$  σύμφωνα με τη μέθοδο του Fichier.

Ο δείκτης παραλλακτικότητας  $F_{ST}$ , ο δείκτης ενδογαμίας  $F_{IS}$ , ο δείκτης  $F_{IT}$  και ο δείκτης Jackknifing υπολογίστηκαν σύμφωνα με τους Weir & Cockerham (1984) με το λογισμικό πακέτο FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002).

Οι γενετικές αποστάσεις  $D$ , οι 2x2 πίνακες γενετικής απόστασης (matrix distance) υπολογίστηκαν σύμφωνα, με τον Nei's minimum genetic distance,  $D_m$  (1972), με το λογισμικό πακέτο POPULATION 1.2.28 (Langella, 1999).

Για την απεικόνιση των δενδρογραμμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι:

- η Neighbor-Joining και η UPGMA με τα λογισμικά πακέτα Phylip 3.62 (Felsenstein, 1989)

- και TreeView 1.6.6 (Roderic, 2001)

Χρησιμοποιήθηκε, επίσης, το πρόγραμμα Genetix 4.0.5.2. το οποίο βοήθησε στην μετατροπή των δεδομένων, που πάρθηκαν από το STRAND, σε κατάλληλη μορφή για το GENEPOP και το FSTAT.

## 2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι 5 μικροδορυφορικές αλληλουχίες χαρακτηρίζονται σχετικά υψηλά πολυμορφικές με 5-17 αλληλόμορφα, (Πίν. 2.2.1.).

**Πίνακας 2.2.1.** Ονομασία, επανάληψη στο κλώνο, εύρος βάσεων και αριθμός αλληλομόρφων των 5 τόπων.

Ονομασία Primer	Επανάληψη στον κλώνο	Εύρος βάσεων	Αριθμός αλληλομόρφων
KWM2b		164-180	8
KWM9b		144-186	16
KWM12a		176-214	17
D08	TG) <sub>18</sub>	095-123	5
Tex Vet 7	(CA) <sub>12</sub>	130-158	11

Ο μέσος αριθμός αλληλομόρφων βρέθηκε σχετικά αρκετά ψηλός (11,4).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 2.2.2.) παρουσιάζεται ο αριθμός των αλληλομόρφων ανά τόπο και πληθυσμό.

**Πίνακας 2.2.2.** Αριθμός αλληλομόρφων ανά τόπο και πληθυσμό

	Ατλαντικός	Κορινθιακός -Πατραϊκός	Αιγαίο	Λεβαντινή	<i>Delphinus delphis</i>
KWM2b	6	5	3	2	1
KWM9b	9	11	2	2	5
KWM12a	7	7	3	4	4
D08	4	5	1	2	2
Tex Vet 7	7	8	1	5	3

Ο εκκινητής KWM9b παρουσίασε το μεγαλύτερο αριθμό αλληλομόρφων στους πληθυσμούς του Ατλαντικού και του Κορινθιακού-Πατραϊκού κόλπου. Επίσης παρουσίασε το μεγαλύτερο αριθμό αλληλομόρφων και για το είδος *Delphinus*



*delphis*. Οι πληθυσμοί του Ατλαντικού και του Κορινθιακού-Πατραϊκού παρουσίασαν υψηλό αριθμό αλληλομόρφων σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς, όχι όμως σε όλους τους τόπους, οι υπόλοιποι πληθυσμοί παρουσίασαν μικρότερους αριθμούς αλληλομόρφων πιθανόν λόγω του μικρού πληθυσμιακού μεγέθους δειγματοληψίας.

Οι αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy – Weinberg εξετάστηκαν για όλα τα ζεύγη των γενετικών τόπων και στις 5 πληθυσμούς (Πίν. 2.2.3.).

**Πίνακας 2.2.3.** ( $H_e$ ) και παρατηρούμενη ( $H_o$ ) ετεροζυγωτία κατά Hardy-Weinberg.

Πειραματική σειρά	$N$	$H_e$	$H_o$	$P_{0,99}$	Μέση τιμή αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο
Ατλαντικός	13	0.5970	0.3692	1.00	6.6000
Κορινθιακός – Πατραϊκός	20	0.5980	0.3300	1.00	7.2000
Αιγαίο	3	0.3444	0.2667	0.6000	2.0000
Λεβαντινή	7	0.3408	0.0857	1.00	3.0000
<i>Delphinus delphis</i>	3	0.5222	0.4000	0.8000	3.0000

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνουμε μη στατιστικά σημαντική διαφορά με  $P > 0.01$  για όλους τους πληθυσμούς με τιμή 1,00, εκτός του πληθυσμού του Αιγαίου και του είδους *Delphinus delphis* που βρέθηκε 0,6000 και 0,8000 αντίστοιχα, οι οποίοι όμως αποτελούνταν από λίγα άτομα, άρα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ο νόμος Hardy – Weinberg ισχύει και άρα υπάρχει ισορροπία. Επίσης ταυτοποιήθηκε φυλογενετικά το διαφορετικό είδος *Delphinus delphis*.

Η μέση τιμή της αναμενόμενης και παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας βρέθηκε,  $H_{exp}$ =0,48048 και  $H_o$ =0,29032 αντίστοιχα.

Ο δείκτης ενδοειδικής ροής γονιδίων  $N_m$ , κατά Barton και Slatkin (1986), δείχνει σχετικά υψηλό αριθμό μετακίνησης ατόμων στους πληθυσμούς (1,45965). Η γενετική παραλλακτικότητα (Gene Diversity) παρουσιάζεται παρακάτω (Πίν. 2.2.4.). Οι περισσότερες πειραματικές σειρές σε όλους τους τόπους διαφέρουν μεταξύ με εύρος τιμών από 0 – 1,000.

Πίνακας 2.2.4. Γενετική ποικιλομορφία ( $F_{ST}$ ) ανά πειραματική σειρά και ανά γενετικό τόπο.

Ονομασία Primer	Ατλαντικός	Κορινθιακός -Πατραϊκός	Αιγαίο	Λεβαντινή	<i>Delphinus delphis</i>
KWM2b	0.526	0.758	0.750	0.286	0.000
KWM9b	0.731	0.745	0.667	0.286	0.917
KWM12a	0.651	0.400	0.833	0.524	1.000
D08	0.500	0.488	0.000	0.143	0.500
Tex Vet 7	0.750	0.713	0.000	0.714	1.000

Η μεγαλύτερη τιμή γενετική ποικιλομορφίας παρουσιάζεται στον πληθυσμό του *Delphinus delphis* στον τόπο KWM12a και Tex Vet 7 με τιμή 1,000, γεγονός που ήταν αναμενόμενο λόγω του διαφορετικού είδους του. Η μικρότερη τιμή παρουσιάζεται στον πληθυσμό του Αιγαίου στους τόπους D08 και Tex Vet 7 λόγω ενδεχομένως του πολύ μικρού αριθμού ατόμων της σειράς.

Ο συντελεστής παραλλακτικότητας  $F_{ST}$  (Theta), ο δείκτης ενδογαμίας  $F_{IS}$  (smallF) και ο δείκτης  $F_{IT}$  (Capf) κατά Weir & Cockerham (1984) παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.5.

Πίνακας 2.2.5. Δείκτης  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$  και  $F_{IS}$  κατά Weir και Cockerham (1984).

Ονομασία Primer	Capf ( $F_{IT}$ )	Theta( $F_{ST}$ )	Smallf( $F_{IS}$ )
KWM2b	0.604	0.109	0.555
KWM9b	0.461	0.012	0.454
KWM12a	0.406	0.077	0.357
D08	0.066	0.009	0.058
Tex Vet 7	0.789	0.031	0.783
All	0.504	0.049	0.479

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι ο δείκτης παραλλακτικότητας σε όλους τους τόπους για όλες τις πειραματικές σειρές είναι της τάξεως του 0,049, δηλαδή αντιπροσωπεύει μια χαμηλή τιμή παραλλακτικότητας.

Πίνακας 2.2.6. Δείκτης  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$  και  $F_{IS}$  με τη μέθοδο Jackknifing.

Όνομασία Primer	Capf ( $F_{IT}$ )	Theta( $F_{ST}$ )	Smallf( $F_{IS}$ )	
KWM2b	0.705	0.116	0.657	Means
	0.246	0.038	0.256	Std.err. Err.
KWM9b	0.401	0.016	0.400	Means
	0.244	0.050	0.261	Std.err. Err.
KWM12a	0.373	0.067	0.323	Means
	0.158	0.064	0.153	Std.err. Err.
D08	0.084	-0.014	0.102	Means Means
	0.117	0.039	0.147	Std.err. Err.
Tex Vet 7	0.768	-0.012	0.768	Means
	0.058	0.075	0.048	Std.err. Err.
All	0.512	0.049	0.487	Means
	0.105	0.020	0.110	Std.err. Err.

Με τη μέθοδο Jackknifing, ο δείκτης  $F_{IT}$  εμφανίζει ένα εύρος τιμών από 0,058 – 0,768 με την μεγαλύτερη και μικρότερη τιμή να παρατηρείται στο τόπο Tex Vet 7. Ο συντελεστής παραλλακτικότητας  $F_{ST}$  παρουσιάζει γενικά μικρές τιμές, με εύρος τιμών 0,012 – 0,116 και μέσο όρο 0,049. Ο δείκτης  $F_{IS}$  εμφανίζει εύρος τιμών 0,048 – 0,768, και όπως και με τον δείκτη  $F_{IT}$  η μεγαλύτερη και μικρότερη τιμή παρατηρείται στον τόπο Tex Vet 7 . Σύμφωνα με το λογισμικό FSTAT για  $F_{IS}$  μεγαλύτερο του αναμενόμενου παρατηρείται μη στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P_{0,95}$ ).

Ο δείκτης  $R_{ST}$  είναι ένας δείκτης παραλλακτικότητας, ο οποίος εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα όταν η μελέτη γίνεται με τη χρήση μικροδορυφόρων. Οι τιμές του δείκτη κατά τον Rousset (1996) για όλους τους τόπους καταγράφεται παρακάτω (Πίν. 2.2.7.):

Πίνακας 2.2.7. Δείκτης  $R_{ST}$

Ονομασία Primer	$R_{ST}$
KWM2b	-0.046
KWM9b	0.086
KWM12a	0.125
D08	0.018
Tex Vet 7	-0.026
All	0.0313

Η τιμή του δείκτη  $R_{ST}$  για όλους τους τόπους κατά τον τον Goodman (1997) είναι 0,0313, και αντιπροσωπεύει μια χαμηλή τιμή.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές του δείκτη ενδογαμίας  $F_{IS}$  για κάθε πειραματική σειρά και για κάθε τόπο (Πίν. 2.2.8.).

Πίνακας 2.2.8. Δείκτης ενδογαμίας  $F_{IS}$  ανά πειραματική σειρά και τόπο

Primer	Ατλαντικός	Κορινθιακός -Πατραϊκός	Αιγαίο	Λεβαντινή	<i>Delphinus delphis</i>
KWM2b	0.268	0.736	-0.333	1000	NA
KWM9b	0.054	0.375	0.600	0.727	0.667
KWM12a	-0.007	0.181	NA	0.000	-0.333
D08	0.795	0.720	NA	0.800	1.000
Tex Vet 7	0.789	0.194	1.000	1.000	-0.091
All	0.415	0.468	0.407	0.780	0.415

Η μέση τιμή του δείκτη ενδογαμίας  $F_{IS}$  για όλες τις πειραματικές σειρές σε όλους τους τόπους βρέθηκε 0,497 , τιμή η οποία αντιπροσωπεύει υψηλό ποσοστό ενδογαμίας.

Η ανάλυση του  $\chi^2$  παραλλακτικότητας των συχνοτήτων των αλληλομόρφων έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ του πληθυσμού του Ατλαντικού με αυτούς των Ελληνικών θαλασσών και της Λεβαντινής Θάλασσας (Μεσογειακή λεκάνη).

Η γονιδιακή διαφοροποίηση, που παρουσιάζεται παρακάτω, στους 5 τύπους για κάθε ζεύγος πειραματικής σειράς του (με \*\*  $P < 0.01$  και NS = μη σημαντικό) έδειξε ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών του Ατλαντικού με αυτά της Μεσογείου (Πίν. 2.2.9.).

**Πίνακας 2.2.9.** Γονιδιακή διαφοροποίηση κατά  $F_{ST}$  μεταξύ των πειραματικών σειρών

	Κορινθιακός -Πατραϊκός	Αιγαίο	Λεβαντινή	<i>Delphinus delphis</i>
Ατλαντικός	**	**	**	**
Κορινθιακός -Πατραϊκός		NS	NS	**
Αιγαίο			NS	**
Λεβαντινή				**

Στον Πίνακα 2.2.10. μαζί με τις τιμές της γενετικής παραλλακτικότητας καταγράφονται και οι τιμές των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των πληθυσμών κατά Nei (1978).

**Πίνακας 2.2.10.** Πίνακας γενετικής απόστασης (κάτω της διαγωνίου) και τιμών  $F_{ST}$  (άνω της διαγωνίου).

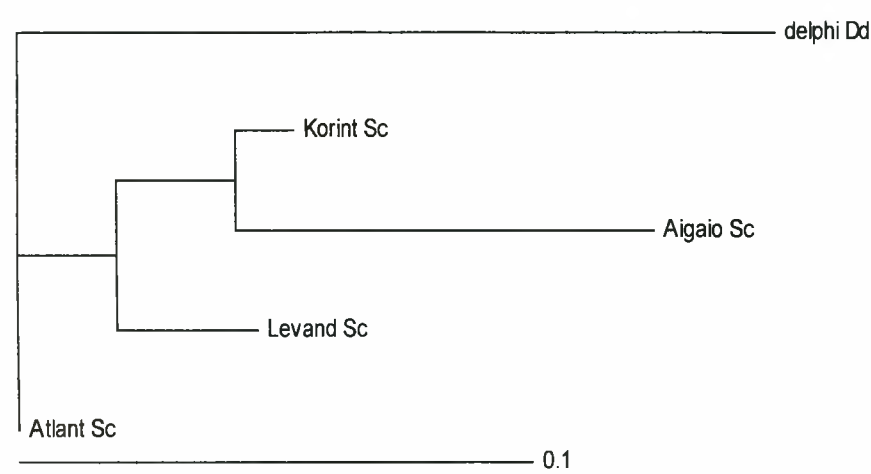
	Ατλαντικός	Κορινθιακός -Πατραϊκός	Αιγαίο	Λεβαντιν ή	<i>Delphinus delphis</i>
Ατλαντικός	0	0.0239	0.0355	-0.002	0.0693
Κορινθιακός -Πατραϊκός	0.0440178	0	0.0133	0.0611	0.1358
Αιγαίο	0.1100260	0.0929444	0	0.0757	0.2214
Λεβαντινή	0.0453568	0.0780918	0.114512	0	0.1701
<i>Delphinus delphis</i>	0.1403680	0.1865560	0.294444	0.187528	0

Η μεγαλύτερη γενετική απόσταση εμφανίζεται μεταξύ των πληθυσμών του Αιγαίου με τον πληθυσμό της Λεβαντινής (0,114512), ενώ η μικρότερη εμφανίζεται μεταξύ των πληθυσμών του Ατλαντικού και του Κορινθιακού-Πατραϊκού Κόλπου με



τιμή (0,0440178), ενώ μεταξύ των πληθυσμών του ατλαντικού και της Λεβαντινής βρέθηκε αρνητική τιμή (-0,002).

Στο σχήμα 2.2.11 φαίνονται σε δενδρόγραμμα οι γενετικές αποστάσεις κατά Nei (minimum genetic distance Dm, 1972) με την Neighbor – Joining μέθοδο.



Σχήμα 2.2.11. Δενδρόγραμμα κατά Nei (1972) με την με τη Neighbor-Joining μέθοδο (radial tree).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω δενδρογράμματα, με τη μέθοδο Neighbor-Joining γίνεται καλύτερη ομαδοποίηση των πειραματικών σειρών ανάλογα με τον τόπο προέλευσης. Άρα μπορούμε να αποφανθούμε πως υπάρχει κάποια συσχέτιση των γενετικών αποστάσεων των πειραματικών σειρών με τις αντίστοιχες γεωγραφικές. Χαρακτηριστικό, αποτελεί το γεγονός ότι ο πληθυσμός του Ατλαντικού έχει τη μεγαλύτερη γενετική απόσταση με όλους εξεταζόμενους πληθυσμούς.

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

#### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, ο στόχος αυτής της έρευνας ήταν να εφαρμοστούν οι γενετικές τεχνικές προς κατανόηση της εξέλιξης της γενετικής σύνθεσης πληθυσμών του ζωνοδέλφινου στην περιοχή του Κορινθιακού-Πατραϊκού Κόλπου και η σύγκρισή τους με τους πληθυσμούς του Αιγαίου, της Λεβαντινής Θάλασσας, του Ατλαντικού, με απώτερο στόχο τη διατήρηση του γενετικού αποθέματος του, στα πλαίσια της συνθήκης ACCOBAMS.

Οι παραπάνω πληθυσμοί αναλύθηκαν σε 5 γενετικούς τόπους χρησιμοποιώντας ετεροειδική PCR ενίσχυση. Πέντε υψηλά πολυμορφικοί τόποι βρέθηκαν με σχετικά υψηλό ποσοστό αλληλόμορφων γονιδίων.

Η τεχνική της μικροδορυφορικής αλληλουχίας, που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία, υπερτερεί έναντι του μιτοχονδριακού DNA και της πρωτεϊνικής ηλεκτροφόρησης λόγω του ότι είναι δείκτης συγκυριαρχίας και κληρονομούνται με τον Μεντελικό τρόπο και επιτρέπει την ανάλυση τόσο των κυρίαρχων όσο και των υποτελών αλληλομόρφων (Moxon & Wills, 1999).

Αξιίζει να σημειωθεί ότι οι γενετικοί τόποι που εξετάστηκαν έχουν σχεδιαστεί για τη φάλαινα δολοφόνο (*Orcinus orca*) και για το ρινοδέλφιο (*Tursiops truncatus*) και κανένας για το ζωνοδέλφιο ή το κοινό δελφίνι, γεγονός που μας υποδηλώνει τη γενετική σχέση των ειδών μέσα στην οικογένεια των Delphinidae. Ακόμη ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη δύο διαφορετικών ειδών στο δείγμα αυτό του ζωνοδέλφινου και του κοινού δελφινιού.

Εξετάστηκαν οι αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy – Weinberg για όλα τα ζεύγη των γενετικών τόπων και για όλους τους πληθυσμούς. Οι 5 πειραματικές σειρές που μελετήθηκαν ακολουθούν το Νόμο Hardy-Weinberg και άρα βρίσκονται σε γενετική ισορροπία μεταξύ των εξελικτικών δυνάμεων και έτσι αποδεικνύεται ότι υπάρχει τυχαία διασταύρωση μεταξύ των ατόμων. Επίσης, η ισορροπία υποδηλώνει ότι η συχνότητα ενός αλληλομόρφου μπορεί να κυμαίνεται από γενιά σε γενιά εξαιτίας τυχαίων γεγονότων (γενετική παρέκκλιση). Επίσης, φαίνεται να υπάρχει απουσία μεταλλάξεων και απουσία φυσικής επιλογής.

Η συνολική ετεροζυγωτία που βρέθηκε είναι χαμηλή και μη στατιστικά σημαντική ( $H_{exp} = 0,48048$ ) (αναμενόμενη ετεροζυγωτία). Παρόλα αυτά, ο

συντελεστής ενδογαμίας  $F_{IS}$  βρέθηκε αρκετά υψηλός (0,479), γεγονός που υποδηλώνει πληθυσμιακή ομογένεια. Τα δεδομένα μας υποδηλώνουν σχετικό υψηλό δείκτη ενδοειδικής ροής γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών ( $N_m=1,45965$ ). Ο συντελεστής παραλλακτικότητας  $R_{ST}$  για όλους τους πληθυσμούς βρέθηκε 0,0313, γεγονός που επιβεβαιώνει την ύπαρξη ενός πληθυσμιακού μεγέθους στη Μεσόγειο.

Η ανάλυση των αλληλομορφικών συχνοτήτων (Fischer exact test) έδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών του Ατλαντικού με αυτούς της Μεσογειακής Λεκάνης.

Οι γενετικές αποστάσεις κατά Nei (1972) απεικονιζόμενες στο δενδρόγραμμα κατά με την Neighbor – Joining μέθοδο, δεν αποκάλυψε έναν ευδιάκριτο διαχωρισμό εντός και μεταξύ των Μεσογειακών πληθυσμών αλλά σημαντικές διαφορές ανιχνεύθηκαν μεταξύ Μεσογειακών και του Ατλαντικού.

Τα παραπάνω μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το ζωνοδέλφινο ίσως να μην έχει σχηματίσει ακόμη τοπικούς απομονωμένους αναπαραγωγικά και γεωγραφικά πληθυσμούς και χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό γονιδιακής ροής ( $N_m=1,45965$ ). Αυτές οι τιμές γονιδιακής ροής ήταν αρκετά υψηλές ώστε να συμπεράνουμε για σχεδόν πανμιξία μεταξύ των πληθυσμών. Υψηλή γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών στηρίζεται σε πολλές άλλες παραδοχές, όπως τυχαία διασταύρωση, ουδέτερα αλληλόμορφα (neutral alleles) και πληθυσμούς σε γενετική ισορροπία (Slatkin, 1985; Waples, 1987; Slatkin & Barton, 1989; Cockerham & Weir, 1993). Εάν οι πληθυσμοί δεν έχουν φτάσει σε γενετική ισορροπία τα *F-statistics* θα υπερκτιμήσουν το βαθμό παρατηρούμενης διαφοροποίησης και ο δείκτης γονιδιακής ροής θα υπερκτιμήσει τις πραγματικές τιμές (Slatkin, 1985). Το σχέδιο αυτό πληθυσμιακής δομής επηρεάστηκε σαφώς από τη κοινωνική δομή των διάφορων ομάδων και τη συμπεριφορά διασποράς τους, αν και οποιεσδήποτε διαφορές που αποκαλύφθηκαν μεταξύ των πληθυσμών, αφορούσαν πιθανώς διαφορές στη χρήση βιότοπου.

Η περιγραφή του γενετικού πολυμορφισμού, που εντάσσεται σε μια γενικότερη προσπάθεια μελέτης της βιοποικιλότητας οικοσυστημάτων, ενδιαιτημάτων, ειδών, πληθυσμών, θεωρείται το πλέον απαραίτητο βήμα τόσο για επιστημονικούς σκοπούς (κατανόηση μηχανισμών επιλογής, προσαρμογής και εξέλιξης των ειδών) όσο και για εφαρμοσμένους (διατήρηση, προστασία, διάσωση αποθεμάτων). Κατά τον προσδιορισμό της πληθυσμιακής δομής των φυσικών πληθυσμών, οι γενετικές πληροφορίες σχετικά με την διαίρεση σε υποπληθυσμούς

έχει πρακτική εφαρμογή στην εγκαθίδρυση βραχυχρόνιων ή μακροχρόνιων στρατηγικών μεθόδων για την διατήρηση και προστασία των ειδών (Lande, 1991; Dizon et al, 1992; Moritz, 1994; Hoelzel, 1998). Οι γνώσεις για την κοινωνική συμπεριφορά και την πληθυσμιακή δομή του ζωνοδέλφινου και του κοινού δελφινιού είναι σε πρώιμο στάδιο και οι αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία είναι ελάχιστες (Calzada & Aguilar, 1995; Notarbartolo di Sciara & Beaezi, 2002). Περισσότερη έρευνα για το είδος του ζωνοδέλφινου είναι απαραίτητη για να δώσουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της γενετικής δομής του είδους τόσο σε επίπεδο πληθυσμού όσο και σε ατόμου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aguilar A., (1991). Calving and early mortality of the western Mediterranean striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 1408-1412.
- Aguilar A., (2000). Population biology, conservation threats and status of Mediterranean Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Journal of Cetacean Research and Management*, 2, 17-26
- Aguilar A & Raga JA (1993). The striped dolphin epizootic in the Mediterranean sea. *Ambio* 22, 524-528.
- Allendorf F.W. & Luikart G., (2007). Conservation and the genetics of populations. *Blackwell Publishing*
- Archer F. & Perrin W., (1999). *Stenella coeruleoalba*. *Mammalian Species*, 603, 1-9.
- Baird RW., Stacey PJ., Whitehead H., (1993). Status of the striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, in Canada. *Can Field Nat*, 107(4), 455-465
- Blanco C., Aznar F.J., Raga J.A., (1994). Food habits of *Stenella coeruleoalba* in the western Mediterranean during the 1990 die-off, with special reference to squids. *European Research on Cetaceans*, 8, 196-198
- Blanco C., Aznar F.J., Raga J.A., (1995). Cephalopods in the diet of the striped dolphin *Stenella coeruleoalba* from the western Mediterranean during an epizootic in 1990. *J Zool Lond*, 237, 151-158
- Bourreau S., Gannier A., (2003). Distribution of *Delphinus delphis* in the Mediterranean Sea: Competition with striped dolphin or fisheries? *Annual meeting of the European Cetacean Society, Tenerife, Spain*.
- Bourret V.J.R., Mace M.R.J.M., Crouau-Rou (2007). Genetic variation and population structure of western Mediterranean and northern Atlantic *Stenella coeruleoalba* populations inferred from microsatellite data. *J Mar Biol Ass UK* 87: 265-269
- Calzada N., Aguilar A., (1995). Geographical variation in body size in western Mediterranean striped dolphins *Stenella coeruleoalba*. *European Research on Cetaceans*, 8, 128-131
- Calzada N., Aguilar A., Lockyer C. and Grau E. (1997) Patterns of growth and physical maturity in the western Mediterranean striped dolphins *Stenella coeruleoalba*. *Canadian Journal of Zoology*, 75 (4), 632-637
- Cardellicchio N., Giandomenico S., Ragone P., Di Leo A., (2000). Tissue distribution of metals in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Apulian coasts, Southern



- Italy. *Marine environmental Research*, 49, 55-66
- Carvalho G.R. & Hauser L., (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4, 326-50
- Cassens Insa, Waerebbek Koen Van, Best Peter, B., Tzika Athanasia, Helden Anton L. Van, Crespo Enrique, A., Milinkovitch Michael, C., (2005). Evidence for male dispersal along the coasts but no migration in pelagic waters in dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Molecular Ecology*, 14, 107-121
- Caurant F., Aubail A., Lahaye V., Canneyt Van, O., Rogan E., Lopez A., Addink M., Churlaud C., Robert E., Bustamante P., (2006). Lead contamination of small cetaceans in European waters- The use of stable isotopes for identifying the sources of lead exposure. *Marine environmental Research*, 62, 131-148
- Cavalloni B., (1993). Cetaceans in the central Mediterranean Sea: distribution and sighting frequencies. *Boll. Zool.*, 60, 131-138
- Cebrian D., Papaconstantinou C., (1992). Distribution of cetaceans in Greece, 1990-1992. *Rapp.Comm.Int.Medit.*, 33
- Cebrian Daniel, (1995). The striped dolphin *Stenella coeruleoalba* epizootic in Greece, 1991-1992. *Biological Conservation*, 74, 143-145
- Cockerham C.C., Weir B.S., (1993). Estimation of gene flow from *F*-statistics. *Evolution*, 47, 855-863
- Desportes G., (1985). *La nutrition des Odontocetes en Atlantique Nord-Est (côtes Français-Iles Feroë)*. Ph.D. Thesis, Universite de Poitiers (France).
- Di Natale, A. (1983). Striped dolphin, *Stenella coeruleoalba* (Meyen) in the central Mediterranean Sea: an analysis of the new data. *Dolphins in the oceans*, (15), 251-27
- Dizon A.E., Lockyer C., Perrin W.F., Demaster D.P., Sisson J., (1992). Rethinking the stock concept: a phylogenetic approach. *Conservation Biology*, 6, 335-364
- Dowling T.E., Moritz C. & Palmer J.D., (1990). Nucleic acids II: restriction site analysis. In Hillis, D.M. and Moritz, C., eds. *Molecular Systematics*. Sunderland, MA: Sinauer, pp. 250-317
- Duguy R., (1978). Researches on the mortality factors of cetaceans on the coast of France. *Aquatic Mammals*, 6, 9-13.
- Forcada J., Aguilar A., Hammond P.S., Pastor X. and Aguilar R., (1994). Distribution and numbers of striped dolphins in the western Mediterranean Sea after the 1990 epizootic outbreak. *Marine Mammal Science*, 10, 137-150.

- Forcada J. and Hammond P.S., (1998). Geographical variation in abundance of Striped and Common Dolphins of the western Mediterranean. *Journal of Sea Research*, 39, 313-325
- Frantzis A. and Herzing D., (2002). Mixed-species associations of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*), short beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) and Risso's dolphins (*Grampus griseus*) in the Gulf of Corinth (Greece, Mediterranean Sea). *Aquatic Mammals*, 28, 188-197.
- Garcia-Martinez J., Moya A., Raga J.A., Latorre A., (1999). Genetic differentiation in the striped dolphin *Stenella coeruleoalba* from European waters according to mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis). *Molecular Ecology*, 8, 1069-1073
- Garcia-Martinez, J., Barrio E., Raga J.A., Latorre A., (1995). Mitochondrial DNA variability of striped dolphins in mediterranean Spanish waters. *Marine Mammal Science*, 11, 183–199
- Gaspari Stefania, (2004). Social and population Structure of Striped and Risso's Dolphins in the Mediterranean Sea. *PhD Thesis, School of Biological and Biomedical Sciences, University of Durham*.
- Gaspari Stefania, Azzelino Arianna, Airoidi Abina, Hoelzel A.Rus, (2007). Social kin associations and genetic structuring of striped dolphin populations (*Stenella coeruleoalba*). *Molecular Ecology*, 16, 2922-2933
- Gkafas G., Podiadis V., Tsigenopoulos K., Reid B., Karpouzli V., Verriopoulos G., Mamuris Z., Magoulas A., Exadactylos A., (2007). Genetic polymorphism and population structure of the striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, and the common dolphin, *Delphinus delphis*, within the ACCOBAMS area. 10<sup>th</sup> International Conference on Environmental Science and Technology, *Cos island, Hellas*, pp. 426-431
- Gomez de Segura A., EA Crespo, SN Pedraza, JA Raga, (2003). Abundance and distribution of striped dolphin, *Stenella coeruleoalba* in Spanish Eastern waters. *Annual meeting of the European Cetacean Society, Tenerife, Spain*.
- Hoelzel Rus, A., Potter Charles W., Best Peter B., (1998). Genetic differentiation between parapatric 'nearshore' and 'offshore' population of the bottlenose dolphin. *The Royal Society*, 265, 1177-1183
- Hoelzel Rus, A., Natoli Ada, Dahlheim Marilyn E., Olavarria Carlos, Baird Robin,

- W., Black Nancy A., (2002). Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. *The Royal Society*, 269, 1467-1473
- Hoelzel Rus, A., (1994). Genetic and Ecology of whales and dolphins. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 25, 377-399
- Kasuya T., (1999). Review of the biology and exploitation of Striped Dolphins in Japan. *Journal of Cetacean Research and Management*, 1, 81-100
- Kinzelbach R., (1997). A record of striped dolphin *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) from the Turkish Mediterranean coast. *Zool. Middle East*, 15, 15-8.
- Knox D. & Verspoor E. (1991). A mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism of potential use for discrimination of farmed Norwegian and wild Atlantic salmon populations in Scotland. *Aquaculture*, 98, 249-257.
- Lander R., (1991). Applications of genetics to management and conservation of cetaceans. *Reports of the International Whaling Commission* 13: 301-311
- Lui Z.J. & Cordes J.F., (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238, 1-37
- Macleod C.D., Bannon S.M., Pierce G.J., Schweder C., Learmonth J.A., Herman J.S., Reid R.J., (2005). Climate change and the cetacean community of north-west Scotland. *Biological Conservation*, 124, 477-483
- Mirimin L., Coughlan J., Rogan E., Cross T.F., (2006). Tetranucleotide microsatellite the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba* Meyen, 1833). *Molecular Ecology*, 6, 493-495
- Miyazaki N., Kasuya T., Nishiwaki M., (1973). Food of *Stenella coeruleoalba*. In: *Scientific Reports of the Whales Research Institute*, pp. 265-275.
- Moritz C., (1994). Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology*, 3, 401-411
- Natoli Ada, Birkun Alexei, Aguilar Alex, Lopez Alfredo, Hoelzel Rus A., (2005). Habit structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *The Royal Society*, 272, 1217-1226
- Notarbartolo di Sciara G., Venturino M.C., Zanardelli M., Bearzi G., Borsani F.J., Cavalloni B., (1993). Cetaceans in the central Mediterranean Sea: distribution and sighting frequencies. *Boll. Zool.*, 60, 131-138
- Notarbartolo di Sciara G. & Bearzi G., (2002). Direct killing and live capture. In :

- Cetaceans in the Mediterranean and Black Seas: State of Knowledge and Conservation Strategies (Ed. by G. Notarbartolo di Sciara), pp. 27–30. A report to the ACCOBAMS Secretariat, Monaco, February 2002
- Perrin W.F., Brownell R.L., (1994). A brief review of stock identity in small marine Cetaceans in relation to assessment of driftnet mortality in the North Pacific. In: *Report International Whaling Commission Special Issue*, 393-401.
- Politi E., Notarbartolo di Sciara, Cussino E., Guido G., (1991). Distribution and frequency of Cetaceans in the waters adjacent to the Greek Ionian islands.
- Podiadis V., Karpouzi V., Diogou N., Verriopoulos G., Exadactylos A. (2008). Seasonal distribution and sighting frequency of cetaceans in the Mediterranean Sea. *VEuropean congress of Mammalogy, Grosseto, Italy*.
- Podiadis, V., Dosi A., Verriopoulou A., Trivourea M., Reichelt M., Hayes Tiekens R. C., Brooke B., Sini M., Trigonis V., Mumme C., Genov T., Zlatar V., Böhler D., Fourniotis Pavlatos P., Prichard D., Veriopoulos G., (2002). Poster titled “The striped dolphins of the Gulf of Corinth, 1996-2002. A comparative study”, *Annual ECS Conference, Las Palmas, Gran Canaria*.
- Pulido J.C. & Duyk G.M., (1994). Marker selection: construction of small insert genomic DNA libraries highly enriched for target short tandem repeat sequences. *Current Protocols in Human Genetics*
- Pulcini M.R., Carlinia R., Wurtz M., (1992). Stomach contents of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba* Meyen, 1833) from the south-central Tyrrhenian coast., 75.
- Ross G.J.B., (1984). The smaller cetaceans of the south east coast of southern Africa. *Annals of the Cape Provincial Museums Natural History* 15, 173-410.
- Raduà M.A., Raga J.A., (1982). Nota sobre los variamentos de *Stenella coeruleoalba* (Meyen 1833) en las costas de la region valenciana. *Memòrias do Museu do Mar, Serie Zoològic*, 2, 1-5.
- Rice D.W., (1998). Marine mammals of the world: systematics and distribution. *Society for Marine Mammalogy, Special Publication Number 4 (Wartzog D, Ed.)*, Lawrence, KS. USA
- Rooney A.P., Merrit D.B., Derr J.N., (1999). Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Hered*, 90, 228–231
- Santos M.B., Pierce G.J., Ross G.J.B., Reid R.J., (1993). Fish and cephalopod prey in small cetaceans from the Scottish coast, 130.
- Schierwater B. & Ender A., (1993). Different thermostable DANN polymerases

- may amplify different RAPD products. *Nucl. Acids Res.*, 21, 4647-4648.
- Shaklee J.B., Phelps S.R., and Salini J., (1990). Analysis of fish stock structure and mixed-stock fisheries by electrophoretic characterization of allelic isozymes. In Whitmore, D.H., ed. *Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 173-196.
- Shinohara M., Domingo-Roura X., Takenaka, O., (1997). Microsatellites in the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. *Molecular Ecology*, 6, 695-696
- Slatkin M., (1985). Gene flow in natural populations. *Ann Rev Ecol Syst*, 16, 393-430
- Slatkin M. & Barton N.H., (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368
- Valsocchi E., Amos W., Raga J.A., Podesta M., Sherwin W., (2004). The effects of inbreeding on mortality during a morbillivirus outbreak in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Animal Conservation*, 7, 139-146.
- Waples R.S., (1997). A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. *Evolution*, 41, 385-400
- Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A., Tingey S.V., (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods of Enzymology*, 218, 704-740.
- Wright J.M. & Bentzen P., (1994). Microsatellites: genetic markers for the future. *Review of Fish Biology*, 4, 384-388
- Wurtz M. and Marrale D. (1993) Food of striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, in the Ligurian Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 73 (3), 571-578
- Wurtz M., Marrale D., (1991). On the stomach contents of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*), Meyen (1833) from the Ligurian coast, central Mediterranean Sea. *5th Conference of the European Cetacean Society* (ed Evans PGH), pp. 62-64.
- Ποδιάδης Β., (2008). Γενετικός πολυμορφισμός και πληθυσμιακή δομή του ζωνοδέλφινου, (*Stenella coeruleoalba*), με στόχο τη διατήρηση του γενετικού αποθέματος στις περιοχές που περιλαμβάνονται στη συνθήκη του ACCOBAMS.
- ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Αλληλόμορφα κάθε γενετικού τύπου στα άτομα κάθε πειραματικής σειράς**

### ***Ατλαντικός***

KWM2b	KWM12a	D08	Tex Vet 7	KWM9b
0407	0114	0205	0808	1111
0505	0112	0204	0707	1313
0505	0110	0204	0707	1313
0505	0101	0202	0606	0810
0108	0110	0205	0210	1313
0505	0116	0202	0404	1212
0205	1616	0105	0808	1616
0407	0215	0204	0108	1515
0505	0110	0205	0808	0106
0508	0116	0202	0707	1313
0505	0101	0202	0707	1313
0505	0101	0202	0707	1313
0505	0101	0202	0707	1313

### ***Κορινθιακός-Πατραϊκός***

KWM2b	KWM12a	D08	Tex Vet 7	KWM9b
0505	0101	0202	0808	0113
0101	0808	0204	0707	1313
0101	0101	0202	0707	0112
0108	0101	0204	0404	0113
0606	0104	0204	0710	0713
0508	0107	0204	0707	0413
0505	0101	0202	0606	1414
0606	0101	0204	0707	0213
0606	0103	0204	0808	1313
0505	0101	0202	0707	1313
0101	0808	0202	0409	1414
0505	0101	0202	0707	0113
0505	0105	0205	0711	0114
0106	0101	0202	0505	0510
0101	0101	0202	0707	0514
0107	0101	0101	0606	1313
0707	0101	0303	0404	0315
0505	0101	0202	0707	1313
0505	0101	0202	0707	0113
0606	0115	0204	0711	1313



### *Aryaio*

KWM2b	KWM12a	D08	Tex Vet 7	KWM9b
0508	0303	0202	0707	1313
0105	0101	0202	0707	1212
0108	0117	0202	0707	1313

### *Αεβαντινή*

KWM2b	KWM12a	D08	Tex Vet 7	KWM9b
0505	0101	0202	0707	1313
0303	1212	0204	0303	0909
0505	0101	0202	0808	1313
0505	0101	0202	0707	1313
0505	0101	0202	0707	1313
0505	0101	0202	0211	1313
0505	0609	0202	0707	1313

### *Delphinus delphis*

KWM2b	KWM12a	D08	Tex Vet 7	KWM9b
0505	0103	0204	0505	0113
0505	1111	0204	1010	0515
0505	1313	0202	0909	0413



αριθμός

ΠΡΩΤΟΤΥΠΟ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ

αριθμός

ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ

αριθμός έκδοσης

ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000097454



αριθμός

ΠΡΩΤΟΤΥΠΟ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ

αριθμός

ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ

αριθμός έκδοσης

ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ  
ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000097454